

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 672**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/56** (2006.01)

**D21C 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2015 PCT/EP2015/067260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2015 E 15744191 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 3174989**

54 Título: **Preparación de ácido láctico y/o una sal de lactato a partir de material lignocelulósico por medio de etapas separadas de sacarificación y fermentación**

30 Prioridad:

**28.07.2014 EP 14178816**

**28.07.2014 EP 14178812**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.11.2024**

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM BV (100.0%)**

**Arkelsedijk 46**

**4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es:

**BAETS, PETER JOHANNES MARIE;**

**SANCHEZ GARCIA, DAVID;**

**GROOT, WILLEM JACOB y**

**DE HAAN, ANDRÉ BANIER**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 987 672 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Preparación de ácido láctico y/o una sal de lactato a partir de material lignocelulósico por medio de etapas separadas de sacarificación y fermentación

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar ácido láctico y/o una sal de lactato por medio de la fermentación de carbohidratos obtenidos a partir de material lignocelulósico.

10 El ácido láctico suele fabricarse por medio de la fermentación de carbohidratos por microorganismos. Una característica común a todos los procesos de fermentación es la necesidad de neutralizar los ácidos excretados por los microorganismos. Un descenso del pH por debajo de un valor crítico, dependiendo del microorganismo utilizado en el procedimiento, podría dañar el procedimiento metabólico del microorganismo y detener el procedimiento de fermentación. Por lo tanto, es práctica común añadir una base en los medios de fermentación a fin de controlar el pH. Esto hace que el ácido láctico producido esté presente en el medio de fermentación en forma de sal de lactato.

15 Entre las fuentes de hidratos de carbono comúnmente utilizadas se encuentran, por ejemplo, la sacarosa, el almidón y el jarabe de azúcar. Por ejemplo, es muy caro cuando se utilizan azúcares refinados y almidón como materia prima para la fermentación. Los materiales lignocelulósicos son fuentes de carbono renovables ampliamente disponibles que no tienen ningún valor alimentario competitivo, son menos costosos y, por lo tanto, son materias primas alternativas atractivas para la obtención de ácido láctico por medio de fermentación. Sin embargo, todavía existe la necesidad en la técnica de mejorar la fermentación a escala comercial de biomasa lignocelulósica para la producción de ácido láctico.

20 La lignocelulosa se compone principalmente de celulosa y hemicelulosa (es decir, polisacáridos formados principalmente por hidratos de carbono fermentable tales como azúcares hexosas y pentosas) que están incrustados en una matriz del polímero fenólico lignina. A fin de obtener carbohidratos fermentables a partir de la lignocelulosa, un material lignocelulósico puede ser sometido a sacarificación por medio de, por ejemplo, enzimas hidrolíticas. A fin de mejorar la accesibilidad de los polisacáridos a la hidrólisis enzimática, puede realizarse previamente un tratamiento físico y/o químico del material lignocelulósico.

25 Cuando los carbohidratos liberados van a ser sometidos a fermentación, es común en la técnica realizar la sacarificación y la fermentación simultáneamente.

El documento WO 2009/025547 describe un procedimiento para la producción de ácido orgánico, incluyendo ácido láctico, que comprende el pretratamiento de biomasa lignocelulósica con un agente alcalino seguido de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  y urea se mencionan específicamente como agentes alcalinos que pueden utilizarse.

30 El documento WO 2013/062407 describe un procedimiento para la conversión de lignocelulosa en un ácido orgánico que comprende una etapa de pretratamiento alcalino y una etapa de fermentación, en la que la fase líquida obtenida en la etapa de fermentación se recicla a la etapa de pretratamiento alcalino y/o a la etapa de fermentación. El material pretratado se somete a SSF en presencia tanto de una enzima hidrolítica como de un microorganismo capaz de convertir los sacáridos en ácido orgánico.

35 Se descubrió que la realización de SSF, mediante el uso de un material lignocelulósico tal como sustrato, sufre de problemas de alta viscosidad. Normalmente, en la SSF, al principio de la reacción de hidrólisis, el material lignocelulósico es un sólido presente en forma de lodo espeso o pasta espesa. Esto hace que sea muy difícil realizar satisfactoriamente la hidrólisis y la fermentación al mismo tiempo.

40 Resulta además que la cantidad de material lignocelulósico que puede utilizarse en la práctica para la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) es relativamente baja (por ejemplo, 10-15 % en peso). En consecuencia, la cantidad de azúcar disponible por hidrólisis en la SSF es también relativamente baja, lo que compromete la eficacia de la producción de ácido láctico.

45 Ahora se ha descubierto que realizando la hidrólisis y la fermentación como dos etapas separadas (SHF) en un sistema en presencia de una sal cáustica de magnesio, cualquier fracción sólida lignocelulósica que pueda estar presente después de la hidrólisis enzimática puede eliminarse sin afectar negativamente a los rendimientos de la producción de ácido láctico. Incluso se ha comprobado que la eliminación de la fracción sólida lignocelulósica reduce significativamente la viscosidad y los sólidos residuales del pienso de fermentación, lo que a su vez mejora la fermentación.

50 La separación de la sacarificación y la fermentación permite además la concentración del pienso de fermentación (por ejemplo, por evaporación de agua), por ejemplo, después de la sacarificación y antes de la fermentación. En caso necesario, un pienso concentrado puede transportarse más fácilmente. En general, el suministro de un pienso concentrado puede traducirse en un procedimiento de fermentación más eficaz. La concentración puede realizarse preferentemente tras la eliminación de dicha fracción sólida lignocelulósica.

55 Estas y otras ventajas de un procedimiento tal como el descrito en la presente memoria se harán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación.

Varios aspectos de la presente invención se refieren a un procedimiento para preparar ácido láctico y/o una sal de lactato que comprende: a) tratar un material lignocelulósico (por ejemplo un material lignocelulósico que puede ser pretratado) con un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio en presencia de agua para proporcionar un material lignocelulósico acuoso tratado; b) sacarificar el material lignocelulósico acuoso tratado en presencia de una enzima hidrolítica para proporcionar un material lignocelulósico acuoso sacarificado que comprende carbohidratos fermentables y una fracción lignocelulósica sólida; c) fermentar los carbohidratos fermentables en el material lignocelulósico acuoso sacarificado por medio de un microorganismo productor de ácido láctico en presencia de un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio para proporcionar un caldo de fermentación acuoso que comprende una sal de magnesio del ácido láctico; y d) recuperar el ácido láctico y/o una sal del ácido láctico del caldo de fermentación; en el que la etapa de sacarificación b) y la etapa de fermentación c) se realizan como dos etapas separadas.

Un procedimiento tal como el descrito en el presente documento puede utilizarse para la producción de ácido láctico y/o sales de lactato a través de la fermentación de carbohidratos derivados de un material lignocelulósico. Las sales de lactato ejemplares incluyen sales con cationes tales como por ejemplo magnesio, calcio, sodio, potasio y amonio, en particular magnesio y calcio y aún más en particular magnesio. En varias realizaciones, un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito puede utilizarse para la producción de lactato de magnesio, calcio, amonio, sodio y/o potasio, más en particular lactato de magnesio. Las sales de lactato pueden acidificarse para obtener el ácido láctico correspondiente o pueden convertirse para obtener otra sal de lactato. Por ejemplo, el lactato de magnesio puede convertirse directamente en ácido láctico o en, por ejemplo, lactato de sodio, que a su vez puede convertirse en ácido láctico.

El término material lignocelulósico, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier fuente de lignocelulosa. Un material lignocelulósico es generalmente de origen biológico y, en particular, de origen vegetal. Aproximadamente el 90% del peso seco de la mayoría de los materiales vegetales se almacena en forma de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, mientras que el resto está constituido por proteínas, cenizas y extractivos tales como azúcares no estructurales, materiales nitrogenados, clorofila y ceras. Por ejemplo, la lignocelulosa se encuentra generalmente en los tallos, hojas, cáscaras y mazorcas de las plantas y en las hojas, ramas y madera de los árboles.

Como se ha indicado anteriormente, la lignocelulosa consiste principalmente en celulosa y hemicelulosa que están incrustadas en una matriz de lignina. La lignocelulosa puede comprender otros hidratos de carbono poliméricos, tales como la pectina, y otros componentes menores. La lignina es un polímero fenólico. La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos, también denominados polímeros de hidratos de carbono, formados principalmente por hidratos de carbono fermentables. También pueden estar presentes en el material lignocelulósico carbohidratos fermentables distintos de los procedentes de la celulosa y la hemicelulosa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "carbohidratos fermentables" se refiere a los carbohidratos que pueden ser fermentados por microorganismos productores de ácido láctico. Generalmente, los carbohidratos fermentables son azúcares C5, azúcares C6, oligómeros solubles de los mismos (por ejemplo, azúcares C12) y/o polímeros solubles de los mismos. Por azúcares C5 y C6 se entienden sacáridos con 5 y 6 átomos de carbono respectivamente y por azúcares C12 se entienden sacáridos con 12 átomos de carbono (por ejemplo, un disacárido). El tipo de carbohidratos fermentables que un microorganismo específico puede fermentar pueden variar y son comúnmente conocidos por la persona de habilidad ordinaria en la técnica o son fácilmente accesibles en la bibliografía publicada. Ejemplos particulares de carbohidratos comunes fermentables por microorganismos productores de ácido láctico, pueden incluir azúcares C5 tal como arabinosa, xilosa y ribosa; azúcares C6 tal como glucosa, fructosa, galactosa, ramnosa y manosa; y azúcares C12 tal como sacarosa, maltosa e isomaltosa. El tipo de azúcar que un microorganismo específico es capaz de fermentar es conocido por el experto.

Un material lignocelulósico adecuado puede seleccionarse entre, por ejemplo, residuos agrícolas (p. ej., paja y bagazo), material herbáceo (p. ej., hierba, hojas y frutos), residuos sólidos urbanos, pasta de papel, residuos de papeleras, residuos de papel, madera y residuos forestales (p. ej., hojas de palmera).

En varias realizaciones, un material lignocelulósico puede obtenerse de cultivos agrícolas, en particular seleccionados de al menos uno de, por ejemplo, maíz, trigo y caña de azúcar. En varias realizaciones, el material lignocelulósico puede obtenerse de árboles, en particular de al menos uno de los siguientes: álamo temblón, eucalipto, abeto, pino, picea, sauce y palma aceitera (incluidas las hojas de palma aceitera). En otras realizaciones, el material lignocelulósico puede ser una biomasa acuática. En el presente documento, el término "biomasa acuática" se refiere a la biomasa producida en un medio acuático por medio de un procedimiento fotosintético. Un material lignocelulósico acuático puede seleccionarse entre, por ejemplo, algas rojas, plantas emergentes, plantas de hoja flotante y plantas sumergidas.

Un material lignocelulósico puede seleccionarse preferentemente entre al menos uno de los siguientes: madera (madera dura o blanda), residuos de maíz (por ejemplo, rastrojos, mazorcas y tallos), residuos de caña de azúcar (por ejemplo, bagazo, sumidades y hojas) y paja (por ejemplo, paja de trigo, paja de maíz, paja de cebada, paja de arroz, paja de centeno).

Un material lignocelulósico puede caracterizarse por un contenido de celulosa y hemicelulosa del 30 al 99 % en peso, basado en el peso seco del material, en particular del 50 al 95 % en peso. Un material lignocelulósico puede caracterizarse preferentemente por un contenido de celulosa del 20 o 30 % en peso al 70 % en peso, basado en el peso seco del material.

5 Un procedimiento tal como el descrito en el presente documento comprende tratar un material lignocelulósico con un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio en presencia de agua para proporcionar un material lignocelulósico acuoso tratado, en la presente memoria también denominado material lignocelulósico tratado. A efectos de la presente descripción, el tratamiento del material lignocelulósico con el agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio se denomina "tratamiento alcalino"

10 Un material lignocelulósico puede utilizarse en cualquier forma adecuada. Un material lignocelulósico estará generalmente en forma sólida (por ejemplo, una partícula o una pasta) o en forma líquida (por ejemplo, una suspensión en agua).

15 Un material lignocelulósico generalmente comprende agua. El agua presente en el material lignocelulósico puede ser generalmente agua presente de forma natural en el material lignocelulósico. Alternativa o adicionalmente, puede añadirse agua al material lignocelulósico antes y/o durante un tratamiento con un agente alcalino tal como el descrito en el presente documento.

20 A los efectos de la presente descripción, un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio también se denomina "agente alcalino que contiene magnesio", o simplemente "agente alcalino". El agente alcalino puede añadirse al material lignocelulósico en forma sólida, en forma de solución acuosa o en forma de suspensión acuosa (por ejemplo, teniendo la sal cáustica de magnesio parcialmente disuelta en agua y parcialmente en forma sólida).

25 Una sal cáustica de magnesio de un agente alcalino tal como se describe en el presente documento puede seleccionarse entre al menos uno de los siguientes: óxido de magnesio ( $MgO$ ), hidróxido de magnesio ( $Mg(OH)_2$ ), carbonato de magnesio ( $MgCO_3$ ), hidrocarbonato de magnesio ( $Mg(HCO_3)_2$ ), silicato alcalino de magnesio, fosfato trimagnésico y fosfato monomagnésico. Preferentemente, la sal cáustica de magnesio se selecciona entre al menos una de las siguientes:  $MgO$ ,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgCO_3$  y  $Mg(HCO_3)_2$ . Más preferentemente, la sal cáustica de magnesio comprende  $MgO$  y/o  $Mg(OH)_2$ . El agente alcalino puede comprender bases distintas de una sal cáustica de magnesio, tal como una sal cáustica de sodio, una sal cáustica de potasio, una sal cáustica de calcio y/o una sal cáustica de amonio, tal como  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $KOH$ ,  $K_2CO_3$ ,  $KHCO_3$ ,  $CaO$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $CaCO_3$ ,  $Ca(HCO_3)_2$ ,  $NH_4OH$ ,  $(NH_4)_2CO_3$ , y  $(NH_4)HCO_3$ , en particular una sal cáustica de sodio y/o una sal cáustica de potasio, más en particular  $Na_2CO_3$ ,  $NaOH$ ,  $K_2CO_3$ , y/o  $KOH$ . Puede preferirse el uso de una sal cáustica de magnesio sin dichas otras sales cáusticas. En particular, el agente alcalino puede comprender predominantemente una sal de magnesio (por ejemplo, más del 90 % en peso, 95 % en peso, preferentemente más del 98 % en peso, basado en la cantidad total en peso de agente alcalino) o incluso consistir únicamente en una sal cáustica de magnesio. En consecuencia, el agente alcalino puede comprender o consistir en al menos uno de  $MgO$ ,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgCO_3$  y  $Mg(HCO_3)_2$ . El agente alcalino puede preferentemente comprender o incluso consistir en  $MgO$  y/o  $Mg(OH)_2$ .

35 Un tratamiento alcalino puede realizarse generalmente añadiendo un agente alcalino que contenga magnesio al material lignocelulósico y mezclando el agente alcalino y el material lignocelulósico en presencia de agua para proporcionar una mezcla de reacción. La mezcla puede realizarse por medio de cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, al menos uno de agitación, agitación, recirculación de fase líquida, seleccionando un caudal adecuado a través de un reactor tubular, o mediante el uso de un transportador de tornillo, una extrusora, una trituradora de hormigón o un lecho de goteo con recirculación de líquido.

Un tratamiento alcalino tal como el en la presente memoria descrito puede realizarse generalmente para un contenido en peso seco de material lignocelulósico del 1 al 70 % en peso, basado en el peso total de la mezcla de reacción (p/p), en particular del 1 al 70 % en peso, del 5 al 50 % en peso, más en particular del 10 al 30 % en peso.

45 El peso en seco del material lignocelulósico puede determinarse antes de añadir el agente alcalino, por ejemplo, filtrando una muestra del material lignocelulósico (por ejemplo, con un papel de filtro de microfibra de vidrio), lavando la torta de filtración con agua y secando la torta durante la noche. Por ejemplo: el material lignocelulósico puede calentarse en aire a  $105^\circ C$  hasta alcanzar un peso constante, de acuerdo con la norma ASTM E1756 - 08.

50 Un tratamiento alcalino tal como el en la presente memoria descrito puede realizarse mediante el uso de una cantidad de sal cáustica de magnesio (excluyendo cualquier otra sal cáustica presente en el agente alcalino) de al menos 0,1 % en peso, basado en el peso seco del material lignocelulósico (p/p). Si en el agente alcalino están presentes otras bases además de las sales cáusticas de magnesio, la cantidad de esas otras bases vendrá determinada por el pH al que se realice el tratamiento alcalino y por el tipo de base utilizada. Un experto en la técnica sabe qué cantidades de otras bases seleccionar en función del pH objetivo y en función de las bases adicionales elegidas.

55 Un tratamiento alcalino tal como el descrito en el presente documento puede realizarse a una temperatura de 15 a  $250^\circ C$ , en particular de 30 a  $200^\circ C$ . Se ha observado que temperaturas superiores a  $250^\circ C$  dan lugar a un grado de degradación no deseado del material lignocelulósico. Se ha observado que temperaturas superiores a  $250^\circ C$  dan

lugar a un grado no deseado de degradación del material lignocelulósico. Las temperaturas inferiores a 15 °C pueden considerarse menos adecuadas, ya que pueden requerir refrigeración sin beneficiar necesariamente al procedimiento.

En varias realizaciones, la temperatura puede ser de 130 a 250°C, tal como por ejemplo de 140°C o de 170°C a 200°C. Se ha observado que estas temperaturas facilitan especialmente la sacarificación posterior, en particular cuando se utiliza un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio, tal como se describe en el presente documento. Un tratamiento a temperaturas tan elevadas puede realizarse aumentando la temperatura por medio de la adición directa al material lignocelulósico de vapor vivo (es decir, vapor a presión) o vapor sobrecalentado, o calentando indirectamente el material lignocelulósico.

En varias realizaciones la temperatura puede ser de 15 a 100 °C, en particular de 30 a 80 °C, y más en particular de 45 a 70 °C. Tales temperaturas pueden ser deseadas, por ejemplo, cuando el material lignocelulósico ha sido tratado previamente y/o cuando el tratamiento alcalino se realiza como una etapa de neutralización. En particular, si el material lignocelulósico ha sido sometido previamente a altas temperaturas puede no ser necesario que el tratamiento alcalino se realice también a altas temperaturas.

Un tratamiento alcalino tal como el descrito en el presente documento puede realizarse durante un periodo de tiempo de menos de 1 minuto a 600 minutos, en particular de 1 minuto a 480 minutos, más en particular de 30 a 250 minutos, aún más en particular de 60 a 150 minutos. El tratamiento alcalino puede realizarse durante menos de 1 minuto. El tiempo de residencia preferente dependerá en gran medida de la temperatura, el pH y el tipo de material lignocelulósico seleccionados, así como de la finalidad del tratamiento alcalino. Por ejemplo, la selección de una temperatura más alta dentro del intervalo definido puede reducir el tiempo de residencia necesario para lograr una hidrólisis eficaz. Análogamente, operar a un pH más alto dentro del intervalo mencionado también permitirá un tiempo de residencia reducido. Los tratamientos alcalinos a temperatura ambiente (por ejemplo, temperaturas de 15 a 45°C) también pueden realizarse durante períodos de tiempo más largos (durante algunas semanas o algunos meses), por ejemplo, sumergiendo el material lignocelulósico en agua que contenga pequeñas cantidades del agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio. Esto puede realizarse, por ejemplo, durante el almacenamiento del material lignocelulósico.

El pH de un tratamiento alcalino tal como el en la presente memoria descrito puede depender del pH inicial del material lignocelulósico, de la cantidad de agente alcalino utilizado y de la cantidad de ácido que pueda liberarse durante el tratamiento. El pH del tratamiento alcalino puede ser generalmente de 4,0 a 14,0, en particular de 4,5 a 13,0, más en particular de 5,0 a 12,0.

En varias realizaciones el pH puede ser de 8,0 a 14,0, en particular de 8,5 a 13,0 y más en particular de 9,0 a 12,0. Se ha comprobado que este pH facilita la posterior sacarificación. En varias realizaciones, el pH puede ser de 4,0 a 9,0, en particular de 4,5 a 8,0.

Antes o simultáneamente con un tratamiento alcalino tal como el descrito anteriormente, un material lignocelulósico puede someterse a tratamientos adicionales, tales como un tratamiento físico (por ejemplo tratamientos mecánicos, tales como trituración, molienda, refinado, extrusión, tratamientos de cizallamiento por presión y/o tratamientos de ondas de presión; tratamientos térmicos, tales como calentamiento; tratamientos de microondas; tratamientos de ultrasonidos; y tratamientos asistidos por campos eléctricos pulsados), un tratamiento fisicoquímico (tratamiento de vapor, tales como explosión de vapor, expansión de fibra con amoníaco (AFEX), explosión húmeda, hidrotermólisis y oxidación húmeda), un tratamiento químico (p. ej., con ácidos, agentes oxidantes, agentes de oxidación, etc.), un tratamiento químico (p. ej., con ácidos, agentes de oxidación, etc.) por ejemplo, con ácidos, agentes oxidantes tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u O<sub>2</sub>, disolventes orgánicos o bases distintas de una sal cáustica de magnesio) y/o un tratamiento biológico (por ejemplo, con hongos de raíz blanca).

En el contexto de un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito, un tratamiento realizado antes de un tratamiento con un agente alcalino que contiene magnesio se denomina pretratamiento. En general, puede realizarse un pretratamiento para descomponer el material lignocelulósico a el fin de, por ejemplo, aumentar la superficie accesible del material lignocelulósico, alterar los componentes de la pared celular del material lignocelulósico, disociar la lignina de la celulosa y la hemicelulosa, aumentar la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a los carbohidratos poliméricos en una etapa posterior de sacarificación, y/o hidrolizar los carbohidratos poliméricos.

En varias realizaciones, un pretratamiento puede comprender un tratamiento físico. En particular, un tratamiento físico puede comprender, preferentemente, un tratamiento mecánico para obtener un material lignocelulósico triturado. La trituración puede realizarse por procedimientos conocidos en la técnica, tal como la molienda, el fresado y la extrusión. Dicho tratamiento aumenta ventajosamente la superficie del material lignocelulósico haciéndolo accesible a tratamientos posteriores.

En varias realizaciones, un pretratamiento puede comprender un tratamiento químico. En particular, un tratamiento químico puede comprender preferentemente un tratamiento ácido (hidrólisis ácida) y/o un tratamiento con disolventes (por ejemplo, extracción). Por ejemplo, puede utilizarse un disolvente para disolver la lignina.

Un tratamiento ácido puede comprender la mezcla de un material lignocelulósico con una solución acuosa ácida que puede incluir uno o más de un ácido inorgánico, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido mineral, un ácido de

Bronsted y un ácido de Lewis. Más habitualmente, el ácido puede ser ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso (solo o en combinación con ion bisulfito), ácido sulfónico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido levulínico, ácido carbónico, ácido glicólico, ácido urónico, ácido glucárico, ácido fluorhídrico, ácido bórico, trifluoruro de boro o cualquier combinación de estos ácidos. También pueden ser útiles las soluciones que contengan sales ácidas, tales como sulfato de aluminio, sulfato férrico, nitrato de aluminio o nitrato férrico. Pueden preferirse el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido sulfuroso (solo o en combinación con ion bisulfito) y el ácido nítrico, y puede preferirse especialmente el ácido clorhídrico. En varias realizaciones, el tratamiento ácido puede ser un tratamiento de sulfito también conocido en la técnica tal como procedimiento de sulfito, por el que se utiliza una mezcla de ácido sulfuroso e ión bisulfito (por ejemplo, bisulfito de calcio) para degradar la lignina.

Aunque los ácidos concentrados pueden ser potentes agentes para la hidrólisis de la celulosa, son concomitantemente tóxicos, corrosivos y peligrosos, por lo que no se prefiere su uso en el presente documento. Los ácidos concentrados también son costosos y difíciles de recuperar. Por lo tanto, es deseable que, cuando se utilice, la solución ácida acuosa de pretratamiento tenga una concentración inferior al 8 % en peso, por ejemplo, inferior al 4 % en peso. Esta etapa de pretratamiento con ácido diluido puede realizarse normalmente a una temperatura de 120 a 230°C. Un experto en la técnica podrá, por supuesto, determinar el tiempo de contacto o de permanencia, la concentración de ácido y la temperatura de contacto adecuados para determinados ácidos y materias primas lignocelulósicas. Y las siguientes enseñanzas pueden, *entre otras cosas*, ser instructivas a este respecto: Esteghalian, A. et al. Modelado y optimización del ácido sulfúrico diluido del pretratamiento de los rastrojos de maíz, álamos y varillas de pasto, *Bioresour. Technol.* 1997,59,129-136). (77); Hinman, N. D. et al. Estimación preliminar del coste de producción de etanol para la tecnología SSF, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1992, 34135, 639-649y, Brennan, A. H. et al. Hidrólisis ácida a alta temperatura de biomasa mediante el uso de un reactor de flujo tapón a escala de ingeniería: Resultado de las pruebas de bajos sólidos, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 1986,17,53-70).

Un tratamiento con disolventes comprenderá generalmente una extracción tal como se utiliza en la presente memoria, el término "extracción" se refiere a cualquier procedimiento o técnica que se aplica antes del tratamiento alcalino con la intención de eliminar los componentes solubles del material lignocelulósico. Si bien dicha extracción se aplicará generalmente para eliminar componentes solubles no fermentables contenidos en el material lignocelulósico, tales como proteínas, aminoácidos y componentes inorgánicos solubles, también se prevé que la preextracción pueda emplearse para eliminar componentes solubles fermentables de la biomasa.

En varias realizaciones, un pretratamiento puede comprender un tratamiento fisicoquímico. En particular, un tratamiento fisicoquímico puede comprender preferentemente un tratamiento con vapor. Por lo general, un tratamiento con vapor puede provocar la autohidrólisis del material lignocelulósico.

Un pretratamiento puede comprender preferentemente al menos un tratamiento ácido (hidrólisis ácida), un tratamiento con disolventes (extracción) y un tratamiento con vapor

Puede realizarse una combinación de varios tratamientos. Por ejemplo, un pretratamiento puede comprender un tratamiento físico en combinación con un tratamiento químico. Por ejemplo, un pretratamiento puede consistir en triturar un material lignocelulósico y someter el material lignocelulósico triturado a un tratamiento ácido o de vapor.

Típicamente, durante un pretratamiento (como un tratamiento de vapor o un tratamiento ácido) se puede reducir el pH del material lignocelulósico. La reducción del pH puede deberse a la adición de ácido como tal (por ejemplo, en un tratamiento ácido), pero también a la liberación de ácidos durante la hidrólisis del material lignocelulósico que suele tener lugar durante un pretratamiento (por ejemplo, en un tratamiento con vapor). En varias realizaciones, antes del tratamiento alcalino descrito en el presente documento, el pH del material lignocelulósico puede ser, por ejemplo, de 1 a 7, en particular de 1,5 a 6, y más en particular de 2 a 4.

Un tratamiento alcalino con un agente alcalino que contenga magnesio tal como el descrito en el presente documento puede realizarse además o alternativamente a un pretratamiento tal como el definido anteriormente. El tratamiento alcalino también puede realizarse simultáneamente a otros tratamientos. Ejemplos particulares incluyen, por ejemplo, el uso de un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio en combinación con un agente oxidante (tal como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el uso de un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio durante la extrusión.

Puede realizarse un tratamiento alcalino tal como el descrito en el presente documento para descomponer el material lignocelulósico tal como se ha descrito anteriormente para los pretratamientos o, en el caso de que se haya efectuado un pretratamiento antes del tratamiento con una sal cáustica de magnesio, para descomponer aún más el material lignocelulósico pretratado. Puede utilizarse cualquiera de las condiciones indicadas anteriormente para el tratamiento alcalino. En particular, dicho tratamiento puede realizarse con una mezcla de reacción que tenga una concentración de sal cáustica de magnesio de 5 a 25% (p/p) y/o a un pH de 9,0 a 12,0, en combinación con una temperatura de: i) 170° a 200°C durante un período de 1 a 240 minutos, preferentemente de 1 a 120 minutos; o ii) 140° a 170°C durante un período de 180 a 600 minutos, preferentemente de 240 a 480 minutos.

Alternativa o adicionalmente, puede realizarse un tratamiento alcalino tal como el descrito en el presente documento para ajustar el pH de un material lignocelulósico a un pH que sea adecuado para, por ejemplo, una sacarificación

5 posterior por hidrólisis enzimática. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando un material lignocelulósico se somete a un pretratamiento ácido o a un pretratamiento que da lugar a la liberación de ácido (por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente) y después se neutraliza por medio de tratamiento con un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio. Puede utilizarse cualquiera de las condiciones indicadas anteriormente para el tratamiento alcalino. En particular, dicha neutralización puede realizarse a un pH de 2,0 a 10,0, típicamente de 4,0 a 9,0, más en particular de 4,5 a 8,0, y aún más en particular de 4,5 a 5,5, de forma opcional a una temperatura de 15 a 100 °C, preferentemente de 30 a 80 °C y de forma opcional durante un período de tiempo de menos de 1 minuto a 30 minutos, en particular de 1 minuto a 15 minutos.

10 Un material lignocelulósico tratado alcalinamente tal como el descrito en el presente documento puede someterse a tratamientos adicionales antes de una sacarificación posterior similares a los descritos anteriormente tal como pretratamientos y otros tratamientos adecuados que pueden ser conocidos en la técnica.

15 Por ejemplo, el material lignocelulósico tratado alcalinamente puede someterse a un tratamiento ácido. Puede realizarse un tratamiento ácido para, por ejemplo, ajustar el pH a un pH adecuado para una posterior sacarificación por hidrólisis enzimática en aquellos casos en los que el pH del material lignocelulósico tratado alcalinamente esté fuera de un intervalo adecuado. Por ejemplo, el pH puede ajustarse de 2,0 a 10,0, en particular de 4,0 a 9,0, más en particular de 4,5 a 8,0, y aún más en particular de 4,5 a 5,5. El tratamiento ácido puede realizarse preferentemente con ácido láctico. El uso de ácido láctico es particularmente ventajoso en un procedimiento tal como el descrito en el presente documento en el que el material lignocelulósico tratado alcalinamente se va a utilizar para proporcionar ácido láctico, ya que evita ventajosamente la necesidad de eliminar el ácido en una fase posterior.

20 Adicional o alternativamente, el material lignocelulósico tratado alcalinamente puede someterse a una separación sólido/líquido, mediante el uso de procedimientos conocidos tales como centrifugación y/o filtración (por ejemplo, microfiltración, filtración de placa y marco, filtración de flujo cruzado, filtración a presión, filtración al vacío y similares).

25 Adicional o alternativamente, el material lignocelulósico tratado alcalinamente puede lavarse. Por ejemplo, el material lignocelulósico tratado alcalinamente puede tratarse con un disolvente, p. ej., para realizar una extracción que elimine componentes solubles no fermentables, tales como lignina solubilizada, proteínas, aminoácidos o componentes inorgánicos solubles (por ejemplo, iones metálicos) contenidos en el material lignocelulósico que puedan interferir con una sacarificación y/o fermentación posteriores. El material lignocelulósico tratado también puede lavarse con una solución acuosa para producir una corriente de lavado y una corriente de sólidos que comprenda el material lignocelulósico tratado.

30 Como se ha descrito en detalle anteriormente, un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito comprende un tratamiento con un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio sola o en combinación con otros tratamientos.

En varias realizaciones específicas, un procedimiento tal como el descrito en el presente documento puede comprender antes de la sacarificación:

- 35
- un tratamiento fisicoquímico que comprenda la trituración mecánica y el tratamiento con vapor (por ejemplo, explosión de vapor), seguido de un tratamiento con un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio;
  - un tratamiento físico tal como molienda mecánica, extrusión, preferentemente molienda mecánica, seguido de un tratamiento con agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio;
- 40
- un tratamiento ácido (por ejemplo, un tratamiento con ácido suave o un tratamiento con sulfito) seguido de un tratamiento con un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio, que comprenda de forma opcional la extracción de lignina;
  - un tratamiento neutro (por ejemplo, un tratamiento físico tal como el descrito anteriormente, tal como la explosión de vapor, sin adición de ácido) seguido de un tratamiento con un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio;
- 45
- un tratamiento con un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio, seguido de un tratamiento ácido (por ejemplo, neutralización con ácido láctico);
  - un tratamiento con un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio, seguido de un tratamiento neutro, tal como un tratamiento por explosión de vapor, que comprenda de forma opcional la extracción alcalina de los grupos acetilo;
- 50
- un tratamiento físico tal como la extrusión o el refinado en presencia de un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio.

Un material lignocelulósico tratado con un agente alcalino que contiene magnesio, tal como se describe en el presente documento, puede utilizarse ventajosamente en la producción de ácido láctico y/o sal de lactato por medio de sacarificación y fermentación separadas, en las que se utiliza un agente alcalino que contiene magnesio para la neutralización durante la fermentación. El uso de un agente alcalino que contiene magnesio en un procedimiento de este tipo excluye la necesidad de eliminarlo entre la sacarificación y la fermentación posterior. El uso de un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio y la posterior sacarificación y fermentación por separado (con una sal cáustica de magnesio como agente neutralizante) también facilita el procesamiento posterior de un procedimiento para la preparación de ácido láctico y/o sal de lactato, tal como se explica en detalle más adelante. Además, en dicho procedimiento cualquier sal cáustica de magnesio separada durante, por ejemplo, la recuperación de ácido láctico y/o sal de lactato, puede reciclarse a una etapa de tratamiento alcalino tal como se describe en el presente documento, minimizando los productos de desecho.

Generalmente, el material lignocelulósico tratado con un agente alcalino que contiene magnesio, tal como se describe en el presente documento, puede someterse a sacarificación y fermentación separadas, en las que la sacarificación y/o la fermentación se realizan a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 4,0 a 9,0; y de forma opcional a una temperatura de 30 a 80 °C, en particular de 45 a 70 °C.

Un procedimiento tal como el descrito en el presente documento comprende sacarificar un material lignocelulósico acuoso tratado alcalinamente tal como el descrito en el presente documento para proporcionar un material lignocelulósico acuoso sacarificado, también denominado en el presente documento material lignocelulósico sacarificado.

En el contexto del procedimiento en la presente memoria descrito, el término sacarificación se refiere a la hidrólisis de polisacáridos en carbohidratos fermentables, que pueden utilizarse como sustratos en una etapa de fermentación posterior. La sacarificación se realiza preferentemente por hidrólisis enzimática. Aunque la hidrólisis puede producirse durante un tratamiento alcalino tal como el descrito en el presente documento o durante una etapa de pretratamiento, la mayor parte de la hidrólisis de los carbohidratos poliméricos del material lignocelulósico tiene lugar durante la sacarificación.

La sacarificación puede realizarse de forma continua, por lotes o por lotes alimentados.

La sacarificación de un material lignocelulósico tratado puede realizarse incubando el material lignocelulósico tratado con una enzima hidrolítica a una temperatura y pH adecuados, durante un periodo de tiempo adecuado.

Puede utilizarse cualquier enzima hidrolítica adecuada conocida en la técnica para la hidrólisis de polisacáridos en carbohidratos fermentables. También pueden utilizarse mezclas de enzimas hidrolíticas. Una enzima hidrolítica es preferentemente al menos una de las celulasas y hemicelulasas, también denominadas enzimas celulolíticas o hemicelulolíticas, y más preferentemente una celulasa. Celulasas tales como CBH1, CBH2, EG y BGL; polipéptidos GH61 que tienen actividad celulolítica potenciadora tal como la descrita en, por ejemplo, en los documentos WO2005/074647, WO 2008/148131y WO 2011/035027 pueden ser particularmente preferentes. Otras enzimas hidrolíticas que pueden utilizarse son, por ejemplo, expansinas; esterasas, tales como la acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72), que cataliza la hidrólisis de los grupos acetilo del xilano polimérico, la xilosa acetilada, la glucosa acetilada, el acetato de alfa-naptilo y el acetato de p-nitrofenilo; lacasas; enzimas ligninolíticas; pectinasas; peroxidases; proteasas; enzimas accesorias amilolíticas; inulinasas, levanasas; e hinchéninas.

Dependiendo de la temperatura del material lignocelulósico tratado alcalinamente y de la temperatura utilizada en una etapa posterior de sacarificación, el material lignocelulósico tratado puede calentarse o enfriarse antes de la sacarificación.

Dependiendo del pH del material lignocelulósico tratado alcalinamente y del pH para una etapa posterior de sacarificación, el pH del material lignocelulósico tratado puede ajustarse antes de la sacarificación. Por ejemplo, el pH puede ajustarse añadiendo un agente alcalino adicional que comprenda una sal cáustica de magnesio o añadiendo una sal cáustica distinta de una sal cáustica de magnesio (como NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, CaO, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>, preferentemente NaOH y/o KOH) al material lignocelulósico tratado para aumentar su pH. El pH también puede ajustarse añadiendo un ácido al material lignocelulósico tratado para disminuir su pH (por ejemplo, ácido láctico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y/o ácido nítrico, preferentemente ácido láctico o ácido clorhídrico, más preferentemente ácido láctico). El ajuste del PH antes de la sacarificación puede realizarse normalmente por medio de acidificación.

Las condiciones de sacarificación pueden depender de la enzima hidrolítica utilizada.

La sacarificación puede realizarse, por ejemplo, a una temperatura de 30 a 80 °C, en particular de 45 a 70 °C. Más en particular, la sacarificación puede realizarse a una temperatura de 50 a 60 °C o incluso más en particular de 50 a 55 °C.

La sacarificación puede realizarse, por ejemplo, a un pH de 2,0 a 10,0, y generalmente se realiza a un pH de 4,0 a 9,0, en particular de 4,5 a 8,0. Más en particular, la sacarificación puede realizarse a un pH de 4,5 a 5,5.

En varias realizaciones, la sacarificación puede llevarse a cabo a una temperatura de 50 a 60 °C y a un pH de 4,5 a 5,5.

5 La sacarificación puede realizarse hasta obtener un grado de hidrólisis adecuado. Por ejemplo, el grado de hidrólisis puede ser del 20% al 99%, en particular del 50% al 95%. Preferentemente, el grado de hidrólisis puede ser de al menos el 80 %, incluso más preferentemente de al menos el 90 %. También puede alcanzarse un grado de hidrólisis del 100%. El grado de hidrólisis puede calcularse a partir de la cantidad de glucosa medida dividida por la cantidad máxima teórica de glucosa. La cantidad de glucosa puede medirse por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por HPLC o reacción enzimática, y la cantidad máxima teórica de glucosa se basa en el contenido original de celulosa en el material lignocelulósico tratado.

10 Generalmente, la sacarificación puede realizarse durante un período de tiempo de 1 hora a 2 semanas, en particular de 12 horas a 1 semana, más en particular unas 72 horas. El tiempo específico puede depender de las condiciones de elección y del grado de conversión deseado. Para una mezcla de sacarificación que contenga un 15 % en peso de material lignocelulósico seco, puede obtenerse una conversión de al menos un 80 % en peso después de llevar a cabo la sacarificación durante unas 72 horas.

15 Un material lignocelulósico acuoso sacarificado, tal como se describe en el presente documento, comprende generalmente carbohidratos fermentables y una fracción lignocelulósica sólida. Los carbohidratos fermentables generalmente están en solución y la fracción sólida lignocelulósica generalmente está en suspensión.

La fracción sólida lignocelulósica comprende generalmente celulosa no hidrolizada, hemicelulosa no hidrolizada y lignina no disuelta.

20 Antes de una fermentación posterior, el material lignocelulósico sacarificado puede someterse a una etapa de separación para separar la fracción lignocelulósica sólida de los carbohidratos fermentables presentes en el material lignocelulósico sacarificado. Puede eliminarse una parte o la práctica totalidad de la fracción sólida lignocelulósica. La etapa de separación proporciona preferentemente un material lignocelulósico sacarificado que comprende carbohidratos fermentables y está sustancialmente libre de fracción lignocelulósica sólida. Preferentemente, el material  
 25 lignocelulósico sacarificado está libre de fracción lignocelulósica sólida y de cualquier otra partícula sólida/insoluble. Sustancialmente libre significa que el material lignocelulósico acuoso sacarificado contiene como máximo un 5 % en peso de fracción lignocelulósica sólida, basado en el peso seco de la fracción lignocelulósica sólida y el peso total del material lignocelulósico acuoso sacarificado. En particular, un material lignocelulósico sacarificado sustancialmente libre de fracción lignocelulósica sólida puede comprender como máximo 1 % en peso, más en particular como máximo  
 30 0,5 % en peso y aún más en particular como máximo 0,1 % en peso de fracción lignocelulósica sólida.

Un etapa de separación utilizado para eliminar la fracción lignocelulósica sólida puede ser generalmente una separación sólido/líquido y puede realizarse por medio de procedimientos conocidos en la técnica. En particular, por filtración (por ejemplo, filtración a presión o filtración al vacío), centrifugación, flotación, sedimentación, decantación y floculación.

35 La fracción sólida lignocelulósica separada puede reciclarse. Por ejemplo, la fracción sólida lignocelulósica puede incorporarse a una etapa de tratamiento de flujo ascendente (por ejemplo, alcalino), en particular a un tratamiento alcalino tal como el descrito en el presente documento. De esta forma, puede aumentarse ventajosamente el rendimiento de carbohidratos fermentables obtenidos a partir de un material lignocelulósico. El reciclaje puede requerir una etapa de purga.

40 La eliminación de la fracción sólida lignocelulósica en esta etapa facilita ventajosamente las etapas posteriores de fermentación y recuperación, y en última instancia puede dar lugar a mejores rendimientos globales y a una mayor pureza del producto de ácido láctico y/o sal de lactato. En particular, la eliminación de la fracción sólida lignocelulósica reduce ventajosamente la viscosidad del material lignocelulósico sacarificado, lo que facilita y favorece una fermentación posterior. En particular, un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito requiere menos  
 45 energía para la mezcla y menos problemas en la fermentación, ya que no se manipulan lodos. La eliminación de la fracción sólida lignocelulósica en esta fase también reduce el volumen que debe procesarse, lo que proporciona un procedimiento de preparación mejorado, por ejemplo, más fácil de realizar y más rentable. Sin estar atado a ninguna teoría, también se sostiene que la presencia de la fracción sólida lignocelulósica durante la fermentación puede interactuar negativamente con los microorganismos utilizados para la fermentación.

50 Adicional o alternativamente, el material lignocelulósico sacarificado puede someterse a tratamientos distintos de la separación sólido/líquido en la presente memoria descrita. Preferentemente, dichos tratamientos pueden realizarse después de dicha separación sólido/líquido.

55 En varias realizaciones, un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito comprende someter el material lignocelulósico acuoso sacarificado a una etapa de concentración antes de la etapa de fermentación. La concentración puede realizarse generalmente para aumentar la concentración de carbohidratos fermentables en el material lignocelulósico acuoso sacarificado. Preferentemente, la concentración puede realizarse tras la eliminación de la fracción sólida lignocelulósica por medio de separación sólido/líquido. La concentración puede realizarse, por ejemplo, por evaporación del agua. Por ejemplo, se puede aumentar la cantidad de carbohidratos fermentables en el material

lignocelulósico sacarificado para favorecer la fermentación. Por ejemplo, la concentración de hidratos de carbono fermentables alcanzada tras la concentración puede ser la especificada a continuación para el medio de fermentación.

5 Entre los tratamientos adicionales que pueden realizarse antes de la fermentación, preferentemente tras la eliminación de la fracción sólida lignocelulósica, se incluyen, por ejemplo, el tratamiento con carbono, el intercambio iónico, el tratamiento con membranas, la extracción. Estos tratamientos pueden realizarse, por ejemplo, para eliminar impurezas. Algunas de las impurezas que pueden eliminarse incluyen compuestos que pueden actuar como inhibidores de los microorganismos productores de ácido láctico utilizados durante la fermentación, tales inhibidores pueden incluir, por ejemplo, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), fenólicos y ácido acético. En consecuencia, en varias realizaciones un procedimiento tal como el descrito en el presente documento comprende someter el material  
10 lignocelulósico acuoso sacarificado a una etapa de desintoxicación previa a la etapa de fermentación.

Un procedimiento tal como el descrito en el presente documento comprende la fermentación de carbohidratos fermentables en el material lignocelulósico acuoso sacarificado por medio de un microorganismo productor de ácido láctico en presencia de un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio para proporcionar un caldo de fermentación acuoso que comprende sal magnésica de ácido láctico.

15 La fermentación puede realizarse de forma continua, por lotes o por lotes alimentados.

La fermentación se realiza generalmente proporcionando un medio de fermentación que comprende carbohidratos fermentables de un material lignocelulósico acuoso sacarificado tal como se describe en el presente documento. El medio de fermentación puede ser un material lignocelulósico acuoso sacarificado tal como (que puede comprender fracción lignocelulósica sólida o puede estar (sustancialmente) libre de fracción lignocelulósica sólida).  
20 Alternativamente, el medio de fermentación puede proporcionarse mezclando el material lignocelulósico acuoso sacarificado (con o sin fracción lignocelulósica sólida) con agua y/o nutrientes adicionales.

En otra realización, el medio de fermentación comprende nutrientes adicionales además del material lignocelulósico sacarificado. El medio de fermentación puede proporcionarse mezclando los nutrientes adicionales con material lignocelulósico sacarificado y, de forma opcional, agua. Los nutrientes adicionales pueden añadirse en cualquier orden y en forma sólida, en solución (por ejemplo, en agua) o en suspensión (por ejemplo, en agua).  
25

Los nutrientes adicionales pueden seleccionarse de entre al menos uno de, por ejemplo, sales minerales (por ejemplo, una fuente de nitrógeno mineral, fosfato, azufre y oligoelementos tales como zinc, magnesio, calcio, manganeso, potasio, sodio, bórico, hierro, cobalto, cobre, molibdeno, níquel, aluminio, etc.), una fuente de hidratos de carbono distinta de los hidratos de carbono fermentables del material lignocelulósico sacarificado (por ejemplo, glucosa, maltosa, fructosa, xilosa, sacarosa, etc.) y una fuente de nitrógeno orgánico (por ejemplo, autolisados e hidrolizados de levadura, hidrolizados de proteínas vegetales, hidrolizados de proteínas animales, subproductos solubles del remojo de trigo o maíz, etc.). Tales fuentes orgánicas de nitrógeno generalmente proporcionan nitrógeno en forma de, por ejemplo, aminoácidos libres, oligopéptidos, péptidos, vitaminas y trazas de cofactores enzimáticos. Aunque los nutrientes adicionales pueden incluir fuentes de carbohidratos, se prefiere que el material lignocelulósico sacarificado sea la única fuente de carbohidratos. Esto simplifica el procedimiento y evita el uso de costosas fuentes de carbohidratos.  
30  
35

La adición de azúcares al fermentador puede realizarse de forma continua, por lotes o por lotes alimentados. La cantidad total de hidratos de carbono fermentables en el fermentador (incluidos los hidratos de carbono derivados lignocelulósicos, así como los azúcares añadidos) al inicio de la fermentación puede ser del 5 al 60 % en peso, basándose en el peso total del medio de fermentación antes de la inoculación con un microorganismo productor de ácido láctico. En varias realizaciones, la cantidad de hidratos de carbono fermentables puede ser del 10 al 50 % en peso, más concretamente del 15 al 30 % en peso. En varias realizaciones, la cantidad de carbohidratos fermentables puede ser del 20 al 60 % en peso, en particular del 30 al 50 % en peso, por ejemplo, después de concentrar el material lignocelulósico sacarificado. El contenido de hidratos de carbono fermentables puede determinarse por procedimientos conocidos en la técnica. Las divulgaciones especialmente instructivas son: Milne et al., Sourcebook of Methods of Analysis for Biomass Conversion and Biomass Conversion Processes. SERI/SP-220-3548. Golden, CO: Solar Energy Research Institute, febrero de 1990 y National Renewable Energy Authority Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en la biomasa: Procedimiento analítico de laboratorio (LAP), revisado en agosto de 2012, <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>. Por ejemplo, la cantidad de carbohidratos fermentables puede medirse por medio de cromatografía de intercambio aniónico de alto pH. Se filtra una muestra del medio de fermentación para separar la fase líquida de cualquier partícula sólida y se obtiene un cromatograma de la fase líquida, por ejemplo, con un detector amperométrico pulsado (HPAEC-PAD). La composición en carbohidratos de la fase líquida puede entonces determinarse basándose en una calibración realizada por medio del uso de estándares apropiados (por ejemplo, estándares de azúcar C5, C6 y/o C12).  
40  
45  
50

55 La fermentación puede realizarse por medio de procedimientos conocidos en la técnica. Generalmente, se añade al medio de fermentación un microorganismo productor de ácido láctico. A continuación, el medio de fermentación que contiene microorganismos se mezcla, por ejemplo, agitándolo y/o removiéndolo.

El pH del medio de fermentación puede ajustarse a un pH adecuado para la fermentación con el microorganismo elegido y esto puede hacerse antes de añadir el microorganismo, si el pH del material lignocelulósico sacarificado está fuera de un intervalo adecuado. Generalmente, el pH puede ajustarse a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 4,0 a 9,0, más en particular de 4,5 a 8,0. Más en particular, el pH puede ajustarse a un pH de 5,5 a 7,5. Por ejemplo, la fermentación a pH neutro puede realizarse a un pH de 6,0 a 8,0. La fermentación a pH bajo puede realizarse a un pH comprendido entre 2,0 y 4,5. El ajuste del pH puede realizarse tal como se ha descrito anteriormente para el material lignocelulósico tratado. Dependiendo del pH inicial del medio de fermentación, el ajuste del pH puede realizarse añadiendo una base (por ejemplo, un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio) o un ácido (por ejemplo, ácido láctico y/o ácido clorhídrico, preferentemente ácido láctico) a dicho material lignocelulósico sacarificado.

El medio de fermentación se fermenta por medio de un microorganismo productor de ácido láctico en presencia de un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio para proporcionar un caldo de fermentación que contiene sal magnésica de ácido láctico. La fermentación se realiza generalmente incubando el medio de fermentación con el microorganismo a una temperatura adecuada durante un período de tiempo adecuado.

Los microorganismos productores de ácido láctico adecuados pueden incluir bacterias, hongos y levaduras.

Los microorganismos productores de ácido láctico pueden seleccionarse entre especies que sean (a) productores homolácticos de ácido láctico, (b) especies heterofermentativas productoras de ácido láctico o (c) especies modificadas genéticamente para producir ácido láctico. Ejemplos de tales especies incluyen, pero no se limitan a, especies de bacterias tal como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Camobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Bacillus* (incluyendo *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thermolactis* y *Bacillus thermoamylovorans*), *Geobacillus* (incluidos *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus thermoglucosidans*), *Caldicellulosiruptor* (incluido *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*), *Clostridium* (incluido *Clostridium thermocellum*), *Thermoanaerobacterium* (incluido *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*), *Thermoanaerobacter* y *Escherichia* (incluida *Escherichia coli*) y especies de hongos y levaduras tal como *Saccharomyces* (incluida *Saccharomyces cerevisiae*), *Kluyveromyces* (incluidas *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*), *Issatchenkia* (incluida *Issatchenkia orientalis*), *Pichia* (incluida *Pichia stipitis*), *Candida* (incluidas *Candida boidinii*, *Candida magnolia*, *Candida methanosorbosa*, *Candida sonorensis* y *Candida utilis*) y *Rhizopus* (incluidos *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microspores* y *Rhizopus oryzae*).

Los géneros bacterianos que pueden ser de particular interés son *Lactobacillus*, *Bacillus* (incluyendo *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thermolactis* y *Bacillus thermoamylovorans*), *Geobacillus* (incluyendo *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus thermoglucosidans*) y *Escherichia* (incluyendo *Escherichia coli*). Adicional o alternativamente, las especies bacterianas preferidas son aquellas que muestran un crecimiento óptimo a un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

La temperatura de incubación puede depender del microorganismo utilizado. Un experto en la técnica puede elegir una temperatura adecuada. Por ejemplo, la temperatura óptima que debe utilizarse puede establecerse analizando la actividad del microorganismo de fermentación en diferentes condiciones de temperatura. Generalmente, la temperatura puede ser de 30 a unos 80 °C, en particular de 45 a 70 °C. Más en particular, la fermentación puede realizarse a una temperatura de 50 a 60 °C.

Un agente alcalino que comprende una sal cáustica de magnesio se añade generalmente al medio de fermentación para neutralizar el ácido láctico excretado por los microorganismos durante la fermentación generando una sal de lactato de magnesio. Un descenso del pH por debajo de un valor crítico, dependiendo del microorganismo utilizado en el procedimiento, podría dañar el procedimiento metabólico del microorganismo y detener el procedimiento de fermentación. El pH se ajusta generalmente durante la fermentación para que sea de 4,0 a 9,0, en particular de 4,5 a 8. Más concretamente, el pH puede ajustarse durante la fermentación entre 5,5 y 7,5. En una realización, la fermentación puede llevarse a cabo a una temperatura de 50 a 60 °C y a un pH de 5,5 a 7,5.

El ajuste del pH durante la fermentación puede realizarse controlando el pH del medio de fermentación y añadiendo cantidades adecuadas de base cuando sea necesario. Una sal cáustica de magnesio del agente alcalino en la presente memoria descrito puede seleccionarse entre al menos una de las siguientes: MgO, Mg(OH)<sub>2</sub>, MgCO<sub>3</sub> y Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, silicato alcalino de magnesio, fosfato trimagnésico y fosfato monomagnésico. Preferentemente, la sal cáustica de magnesio se selecciona entre al menos una de las siguientes: MgO, Mg(OH)<sub>2</sub>, MgCO<sub>3</sub> y Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Más preferentemente, la sal cáustica de magnesio comprende MgO y/o Mg(OH)<sub>2</sub>. El agente alcalino puede comprender una base distinta de una sal cáustica de magnesio, por ejemplo, una cáustica tal como el amoníaco, una sal cáustica de sodio, una sal cáustica de potasio, una sal cáustica de calcio y/o una sal cáustica de amonio, tal como NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, CaO, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>. También puede utilizarse amoníaco tal como base adicional. Puede preferirse el uso de una sal cáustica de magnesio sin dichas otras bases. En particular, el agente alcalino puede comprender predominantemente una sal de magnesio (por ejemplo, más del 90 % en peso, 95 % en peso, preferentemente más del 98 % en peso, basado en la cantidad total en peso de agente alcalino) o incluso consistir únicamente en una sal cáustica de magnesio. En consecuencia,

el agente alcalino puede comprender o consistir en al menos uno de  $MgO$ ,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgCO_3$  y  $Mg(HCO_3)_2$ . El agente alcalino puede preferentemente comprender o incluso consistir en  $MgO$  y/o  $Mg(OH)_2$ .

5 La cantidad total de sal cáustica de magnesio que debe añadirse en un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito puede determinarse por la cantidad molar de ion magnesio y la cantidad molar de ácido láctico que debe neutralizarse para formar una sal magnésica de ácido láctico. Por ejemplo, la cantidad total de sal cáustica de magnesio (incluida cualquier sal cáustica de magnesio presente en el material lignocelulósico sacarificado derivado del tratamiento alcalino con un agente magnesio-alcalino) puede ser de  $\frac{1}{2}$  mol de sal cáustica de magnesio seleccionada entre al menos una de  $MgO$ ,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgCO_3$  y  $Mg(HCO_3)_2$  por 1 mol de ácido láctico. Generalmente, la cantidad total de sal cáustica de magnesio puede ser del 5 al 40 % en peso de sales cáusticas de magnesio en base al peso total del material lignocelulósico seco sometido al tratamiento magnesio-alcalino, en particular del 10 al 35 % en peso.

10 En general, la fermentación puede detenerse preferentemente cuando el caldo de fermentación está sustancialmente libre de carbohidratos fermentables, por ejemplo, cuando el contenido de carbohidratos fermentables en la fase líquida del caldo de fermentación es inferior a 5 g/l. La cantidad de hidratos de carbono fermentables puede controlarse sometiendo muestras del caldo de fermentación a una etapa de separación sólido/líquido, para eliminar cualquier sólido de la fase líquida, y midiendo el contenido de azúcares C5, C6 y/o C12 en la fase líquida, tal como se ha descrito anteriormente para el medio de fermentación.

15 En un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito, la etapa de sacarificación y la fermentación se realizan como dos etapas separadas. Tales procesos se conocen en la técnica como hidrólisis y fermentación separadas (SHF). En el contexto de esta solicitud, una sacarificación y fermentación separadas, significa que la sacarificación se realiza en ausencia de microorganismos productores de ácido láctico, en otras palabras, no se añade activamente ningún microorganismo productor de ácido láctico al material lignocelulósico durante la sacarificación. Sin embargo, en un procedimiento tal como el descrito en el presente documento, la sacarificación puede producirse en presencia de pequeñas cantidades de microorganismos productores de ácido láctico, que pueden estar presentes debido a la contaminación, por ejemplo, del medio ambiente. La cantidad de ácido láctico resultante de la presencia de microorganismos productores de ácido láctico en la sacarificación, es generalmente inferior al 10 % en peso, en particular inferior al 5 % en peso, y más en particular inferior al 0,1 % en peso, basado en la cantidad total en peso de material lignocelulósico sacarificado.

20 La sacarificación y la fermentación pueden realizarse en un único reactor, por ejemplo, añadiendo microorganismos productores de ácido láctico al material lignocelulósico sacarificado una vez que se ha alcanzado el grado deseado de sacarificación, por ejemplo, un grado de sacarificación tal como el indicado anteriormente.

25 La sacarificación y la fermentación pueden realizarse en varios reactores, al menos dos, conectados en serie. La sacarificación puede tener lugar en un primer reactor que comprenda enzimas hidrolíticas (sin microorganismos productores de ácido láctico), y la fermentación puede tener lugar en un segundo reactor que comprenda microorganismos productores de ácido láctico.

30 Una sacarificación y fermentación separadas permite eliminar las fracciones lignocelulósicas sólidas presentes en el material lignocelulósico sacarificado antes de la fermentación, tal como se ha descrito anteriormente. La eliminación de la fracción sólida lignocelulósica mejora ventajosamente la fermentación y las etapas posteriores del procedimiento. En particular, por medio de la eliminación de la fracción lignocelulósica sólida se puede reducir la viscosidad del material lignocelulósico sacarificado, se puede conseguir un mayor rendimiento de la producción de ácido láctico o se puede conseguir un rendimiento objetivo de ácido láctico en un periodo de tiempo más corto. Además, se facilita el procesamiento del caldo de fermentación.

35 Además, al tener una sacarificación y fermentación separadas, cada etapa puede ser operado a diferentes pH y temperatura, por lo tanto, operando en las condiciones óptimas para cada etapa del procedimiento. Las condiciones óptimas para cada etapa dependerán de la enzima hidrolítica y del microorganismo elegidos para la sacarificación y la fermentación, respectivamente. Otros factores, tal como la naturaleza del material lignocelulósico utilizado o la sal cáustica de magnesio empleada en el tratamiento alcalino, también pueden influir en las condiciones óptimas. Las condiciones óptimas para la sacarificación pueden ser, por ejemplo, un pH de 4,5 a 5,5 y una temperatura de 50 a 60 °C. Las condiciones óptimas para la fermentación pueden ser, por ejemplo, un pH de 5,5 a 7,5 y una temperatura de 50 a 60 °C.

40 Además, tal como se ha descrito anteriormente, una sacarificación y fermentación por separado mejora la eliminación de impurezas, por ejemplo, la fracción lignocelulósica sólida, y/o inhibidores, que pueden afectar negativamente a la fermentación, por ejemplo, reduciendo la actividad de los microorganismos utilizados durante la fermentación.

45 Un caldo de fermentación acuoso proporcionado por una fermentación tal como la descrita en el presente documento comprende lactato de magnesio. En una realización, el caldo de fermentación comprende lactato de magnesio en solución. En otra realización, el caldo de fermentación comprende lactato de magnesio en forma sólida. El lactato de magnesio en forma sólida puede comprender cristales de lactato de magnesio. Preferentemente, el caldo de fermentación comprende cristales de lactato de magnesio. Se entiende que en el caso de un caldo de fermentación

que comprende lactato de magnesio en forma sólida, el caldo de fermentación también comprende lactato de magnesio en solución, es decir, una solución saturada de lactato de magnesio.

5 Un caldo de fermentación acuoso proporcionado por una fermentación tal como la descrita en el presente documento comprende una fracción de microorganismos que comprende microorganismos productores de ácido láctico utilizados en la fermentación.

El caldo de fermentación acuoso puede comprender además otras impurezas sólidas, tales como impurezas derivadas de la fermentación y/o derivadas del material lignocelulósico (por ejemplo, una fracción lignocelulósica sólida tal como se ha descrito anteriormente).

10 Si se ha realizado una etapa de separación antes de la fermentación para eliminar la fracción lignocelulósica sólida del material lignocelulósico sacarificado, el caldo de fermentación puede estar generalmente sustancialmente libre de fracción lignocelulósica sólida. Preferentemente, el caldo de fermentación acuoso no contiene fracción lignocelulósica sólida. Sustancialmente libre significa que el caldo de fermentación acuoso contiene como máximo un 5 % en peso de fracción lignocelulósica sólida, basado en el peso total del caldo de fermentación, incluida la fracción de microorganismos. En particular, un caldo de fermentación sustancialmente libre de fracción lignocelulósica sólida puede comprender como máximo 1 % en peso, más en particular como máximo 0,5 % en peso y aún más en particular como máximo 0,1 % en peso de fracción lignocelulósica sólida.

Un procedimiento tal como el descrito en el presente comprende aislar ácido láctico y/o sal de lactato de un caldo de fermentación acuoso que comprende lactato de magnesio tal como se ha descrito anteriormente. El aislamiento del ácido láctico y/o de la sal de lactato también puede denominarse recuperación. En esta etapa, el producto de fermentación deseado (ácido láctico en forma de lactato de magnesio) se aísla o se recupera del caldo de fermentación. El aislamiento puede comprender al menos una de las siguientes etapas: separación (por ejemplo, separación sólido/líquido), concentración, enfriamiento, cristalización (por ejemplo, cristalización por evaporación y/o cristalización por enfriamiento) y lavado. El aislamiento comprende preferentemente una separación y, de forma opcional, una cristalización. Puede preferirse una separación sólido/líquido. Una separación sólido/líquido puede comprender, por ejemplo, flotación, sedimentación, floculación, centrifugación, filtración y combinaciones de las mismas. La filtración puede comprender al menos una de las siguientes técnicas: microfiltración, filtración de placas y marcos, filtración de flujo cruzado, filtración a presión y filtración al vacío. La cristalización puede comprender una etapa de concentración y/o enfriamiento. La concentración puede realizarse por eliminación del agua (por ejemplo, al vacío). Parte de esta etapa de concentración puede tener lugar ya durante la fermentación. De forma opcional, la concentración puede ir seguida de un enfriamiento. La concentración y/o el enfriamiento pueden proporcionar lactato de magnesio en forma sólida, en particular cristales de sal orgánica de magnesio, dando lugar a una cristalización. El enfriamiento puede realizarse para alcanzar temperaturas inferiores a 20 °C. Sin embargo, en general se prefiere que la cristalización tenga lugar a una temperatura de 20 a 95 °C, en particular de 50 a 90 °C. La cristalización a estas temperaturas (por ejemplo, sin enfriamiento) puede permitir ventajosamente que una mayor cantidad de otras impurezas permanezcan en la fase líquida, evitando así su coprecipitación o cocristalización con los cristales de lactato de magnesio.

En varias realizaciones, un aislamiento tal como el descrito en el presente documento comprende someter un caldo de fermentación que comprende lactato de magnesio en solución a una separación sólido/líquido para proporcionar una fase líquida separada que comprende un residuo sólido. La separación sólido/líquido puede realizarse preferentemente a una temperatura comprendida entre 20 y 75 °C, en particular entre 25 y 70 °C, y más en particular entre 30 y 60 °C. Ventajosamente, a estas temperaturas son lo suficientemente altas para que el lactato de magnesio permanezca en solución mientras se mantienen algunos otros componentes en estado sólido. Realizando la separación sólido/líquido a estas temperaturas se puede mejorar la separación. A dichas temperaturas, la viscosidad del filtrado también puede ser menor. De forma opcional, la fase líquida separada que comprende lactato de magnesio en solución puede someterse a concentración y/o enfriamiento, proporcionando una fase líquida separada que comprende lactato de magnesio en forma sólida, preferentemente que comprende cristales de lactato de magnesio. La fase líquida así obtenida que comprende lactato de magnesio en forma sólida puede someterse a una segunda separación sólido/líquido para proporcionar lactato de magnesio sólido separado, que comprende preferentemente cristales de lactato de magnesio.

50 En varias realizaciones un aislamiento tal como se describe en el presente documento comprende someter un caldo de fermentación que comprende lactato de magnesio en solución a concentración y/o enfriamiento para proporcionar un caldo de fermentación que comprende lactato de magnesio en forma sólida y someter el caldo de fermentación que comprende lactato de magnesio en forma sólida a una separación sólido/líquido para proporcionar una fase sólida separada que comprende lactato de magnesio en forma sólida. El lactato de magnesio en forma sólida comprende preferentemente cristales de lactato de magnesio. La separación también proporcionará una fase líquida separada. La fase líquida separada puede comprender un residuo sólido (por ejemplo, en suspensión).

En varias realizaciones, un aislamiento tal como el descrito en el presente documento comprende someter un caldo de fermentación que comprende lactato de magnesio en forma sólida a una separación sólido/líquido para proporcionar una fase sólida separada que comprende lactato de magnesio en forma sólida. El lactato de magnesio sólido separado

puede comprender preferentemente cristales de lactato de magnesio. La separación también proporcionará una fase líquida separada. La fase líquida separada puede comprender un residuo sólido (por ejemplo, en suspensión).

5 Una separación sólido/líquido para separar el lactato de magnesio en forma sólida (por ejemplo, cristales de lactato de magnesio) puede realizarse, por ejemplo, por filtración mediante el uso de un filtro con un tamaño de poro adecuado para retener el lactato de magnesio sólido (por ejemplo, cristales de lactato de magnesio) en el filtro y permitir la posterior eliminación de impurezas, incluido cualquier residuo sólido restante, por ejemplo, por medio del lavado de la torta de filtración. La separación sólido/líquido también puede realizarse aprovechando la diferencia de densidad entre el lactato de magnesio sólido y el residuo sólido. Por ejemplo, puede utilizarse un separador ciclónico. Los separadores ciclónicos son conocidos en la técnica. Se hace referencia, por ejemplo, al documento US 4.734.109.

10 El residuo sólido en las fases líquidas o sólidas separadas comprende generalmente una fracción de microorganismos (también denominada en la técnica biomasa) y, de forma opcional, una fracción sólida lignocelulósica. El residuo sólido puede comprender otras impurezas sólidas, tales como impurezas derivadas de la fermentación. Si la fracción lignocelulósica sólida se retira del material lignocelulósico sacarificado antes de la fermentación, el residuo sólido separado puede estar generalmente sustancialmente libre de fracción lignocelulósica sólida. Preferentemente, el  
15 residuo sólido separado no contiene fracción sólida lignocelulósica. Sustancialmente libre significa que el residuo sólido contiene como máximo un 5 % en peso, preferentemente como máximo un 1 % en peso, más preferentemente como máximo un 0,5 % en peso, más en particular como máximo un 0,1 % en peso de fracción lignocelulósica sólida. El % en peso se basa en la masa total de residuos sólidos.

20 Un caldo de fermentación que comprenda lactato de magnesio en forma sólida (por ejemplo, que comprenda cristales de lactato de magnesio) permite ventajosamente separar fácilmente el lactato de magnesio de otras impurezas presentes en el caldo de fermentación, en particular las impurezas procedentes del material lignocelulósico (por ejemplo, la fracción lignocelulósica sólida), así como cualquier impureza derivada de la fermentación (por ejemplo, la fracción de microorganismos). Las impurezas separadas pueden enviarse a las aguas residuales o utilizarse ventajosamente para producir biogás o para la recuperación de energía.

25 Un caldo de fermentación que comprenda lactato de magnesio en solución permite ventajosamente un control de la cristalización del lactato de magnesio, permitiendo una flexibilidad en la realización de una separación sólido/líquido antes y/o después de la cristalización tal como se ha descrito anteriormente. Este control y flexibilidad permiten ventajosamente mejorar la eliminación de las impurezas sólidas y solubles presentes en el caldo de fermentación. Estas impurezas pueden convertirse, por ejemplo, tras separarlas del lactato de magnesio, en un fertilizante o utilizarse  
30 directamente como fertilizante. La conversión de las impurezas en abono puede comprender al menos una etapa de tratamiento seleccionada entre una evaporación, una concentración, una reacción química (por ejemplo, con fosfatos, amoníaco y/o sales de potasio), una precipitación y una separación sólido/líquido. Algunos ejemplos de abonos que pueden obtenerse son los abonos ricos en magnesio (por ejemplo, la estruvita).

35 Un procedimiento descrito en el presente documento comprende preferentemente una etapa de separación sólido/líquido para proporcionar una fase sólida separada que comprende lactato de magnesio en forma sólida y una fase líquida separada. Tal como se ha indicado anteriormente, la fase líquida separada puede comprender un residuo sólido (por ejemplo, en suspensión).

40 Una fase líquida separada puede reciclarse de forma opcional a una etapa anterior del procedimiento descrito en el presente documento, por ejemplo, a la etapa de sacarificación. Esta etapa de reciclado puede reducir ventajosamente la cantidad de agua fresca que es necesario añadir al sistema. Además, esta etapa de reciclado puede reducir las pérdidas de lactato de magnesio residual presente en la fase líquida. Preferentemente, cualquier residuo sólido que pueda estar presente en la fase líquida separada puede eliminarse antes del reciclado (por ejemplo, por medio de una separación sólido/líquido adicional).

45 Generalmente, el rendimiento de recuperación del ácido láctico en forma de lactato de magnesio, por ejemplo, en forma de cristales de lactato de magnesio, puede ser del 50 % al 99 %, en particular del 70 % al 95 % sobre la base de la cantidad de ácido láctico producido durante la fermentación.

50 Un procedimiento tal como el en la presente memoria descrito proporciona ventajosamente un lactato de magnesio, y cualquier sal de lactato o ácido láctico derivado del mismo de alta pureza, a pesar de utilizar material lignocelulósico como fuente de carbohidratos. Por ejemplo, un lactato de magnesio separado por un procedimiento tal como el descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende cristales de lactato de magnesio) puede tener una pureza de 90 a 99,9 % en peso, en particular de 95 a 99,5 % en peso, más en particular de 98 a 99 % en peso.

El lactato de magnesio obtenido por fermentación puede ser procesado adicionalmente para aumentar aún más la pureza del lactato de magnesio, para proporcionar otras sales de lactato y/o para proporcionar ácido láctico.

55 Pueden realizarse otras etapas de procesamiento directamente en el caldo de fermentación que contiene lactato de magnesio (en solución o en forma sólida, por ejemplo, cristales de lactato de magnesio). Al realizar otras etapas de procesamiento directamente en el caldo de fermentación que contiene lactato de magnesio, un procedimiento para obtener una sal de lactato o ácido láctico puede acortarse ventajosamente, puede ser menos costoso y los

rendimientos de recuperación de sal de lactato/ácido láctico pueden mejorarse al evitar uno o más de los etapas de separación descritos anteriormente.

Después de una separación tal como la descrita anteriormente, es decir, sobre una fase separada que comprende lactato de magnesio, preferentemente que comprende lactato de magnesio en forma sólida, y más preferentemente que comprende cristales de lactato de magnesio, pueden realizarse otras etapas de procesamiento. Al realizar otras etapas de procesamiento en una fase separada que comprende lactato de magnesio como se describe en la presente memoria, el lactato de magnesio puede transformarse en ácido láctico o en una sal de lactato diferente. Además, o alternativamente, pueden realizarse otras etapas de procesamiento para mejorar la pureza del lactato de magnesio y de cualquier sal de lactato o ácido láctico obtenido a partir de él.

En varias realizaciones, el lactato de magnesio puede tratarse con un ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y/o ácido nítrico, preferentemente ácido clorhídrico) en presencia de agua para proporcionar ácido láctico en solución y una sal de magnesio insoluble. Por ejemplo, si se utiliza ácido clorhídrico, se obtiene cloruro de magnesio. A continuación, el ácido láctico puede separarse de la sal de magnesio por medio de, por ejemplo, una separación líquido/líquido, por ejemplo, incluyendo etapas de extracción y retroextracción (se hace referencia a, por ejemplo, el documento WO2013/093047). La sal de magnesio, y el cloruro de magnesio en particular, puede someterse ventajosamente a un procedimiento de desdoblamiento térmico de la sal (TSS) para obtener óxido de magnesio y ácido clorhídrico. TSS puede realizarse, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO0017378, WO 2013/025107, WO 2013/093028y WO 2013/093047 y WO 2013/174911. El uso de SST permite ventajosamente que el óxido de magnesio y/o el ácido clorhídrico así obtenidos se reciclen en el procedimiento en la presente memoria descrito. Una pequeña fracción del ácido láctico obtenido también puede reciclarse de nuevo en el procedimiento de producción, por ejemplo, en la acidulación de la biomasa lignocelulósica tratada alcalinamente antes de la hidrólisis, tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización interesante del procedimiento actualmente recitado, el etapa d) comprende recuperar lactato de magnesio de dicho caldo de fermentación acuoso, y dicho procedimiento comprende además: e) proporcionar una alimentación que comprende cloruro de hidrógeno, siendo dicha alimentación una solución acuosa que comprende cloruro de hidrógeno o una alimentación gaseosa que comprende cloruro de hidrógeno gaseoso; f) acidificar el lactato de magnesio recuperado a ácido láctico poniendo dicho lactato de magnesio en contacto con dicha alimentación que comprende cloruro de hidrógeno, formando así un efluente líquido que comprende ácido láctico y cloruro de magnesio; g) separación de la lignina del efluente líquido de la etapa f); y h) separación del ácido láctico y el cloruro de magnesio presentes en el efluente líquido de la etapa g) para obtener una corriente de ácido láctico y una solución o suspensión de cloruro de magnesio. La etapa de separación h) puede comprender, por ejemplo, una etapa de extracción de ácido láctico.

La solución o suspensión de cloruro de magnesio así separada (etapa g)) puede entonces someterse a una temperatura de al menos 300°C, descomponiendo así el cloruro de magnesio en óxido de magnesio y cloruro de hidrógeno y obteniendo así un sólido que comprende óxido de magnesio y un gas que comprende cloruro de hidrógeno gaseoso. A su vez, el óxido de magnesio así obtenido puede utilizarse directamente en al menos una de las etapas a) y c) del procedimiento descrito o, alternativamente, como precursor de una sal cáustica de magnesio utilizada en al menos una de las etapas a) y c); en cuanto a esta última posibilidad, el  $Mg(OH)_2$  puede obtenerse, por ejemplo, apagando este óxido de magnesio. También se considera que el calor conservado en el óxido de magnesio sólido procedente de la descomposición térmica del cloruro de magnesio puede transferirse al material lignocelulósico de la etapa a) y/o al caldo de fermentación de la etapa c). Y aún más, la alimentación que comprende cloruro de hidrógeno tal como se utiliza en la etapa e) anterior puede derivarse, al menos parcialmente, de cloruro de hidrógeno gaseoso obtenido a partir de la descomposición térmica del cloruro de magnesio.

En varias otras realizaciones, el lactato de magnesio puede someterse a una etapa para convertir el lactato de magnesio (primera sal de lactato) en una sal de lactato diferente (segunda sal de lactato). Por ejemplo, un lactato de magnesio puede someterse a una reacción de intercambio de sales con una base monovalente (por ejemplo, al menos una de NaOH,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ , KOH,  $K_2CO_3$ ,  $KHCO_3$ ,  $NH_4OH$ ,  $(NH_4)_2CO_3$ , y  $(NH_4)HCO_3$ , preferentemente NaOH y/o KOH) para formar una sal de lactato monovalente y una sal de magnesio (por ejemplo, hidróxido de magnesio). Véase también los documentos WO 2005/123647 y WO2010/063762 que describen la producción de ácido láctico y/o sal de lactato a partir de un medio que contiene lactato de magnesio por medio de una reacción de intercambio de sales entre el lactato de magnesio y una base monovalente. En particular, tal como se describe en el documento WO 2005/123647 el lactato de magnesio puede reaccionar con la base monovalente a un pH comprendido entre 9 y 12, preferentemente entre 9,5 y 11, para formar una sal de lactato monovalente e hidróxido de magnesio.

Cuando se utiliza un procedimiento tal como el descrito en el presente documento para preparar ácido láctico, el lactato de magnesio o la segunda sal de lactato pueden convertirse en ácido láctico por medio de un procedimiento de intercambio iónico, por ejemplo, por medio del uso de una columna de intercambio iónico o electrodiálisis. El lactato de magnesio o la segunda sal de lactato también pueden acidificarse con un ácido fuerte (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y/o ácido nítrico, preferentemente ácido clorhídrico) tal como se ha descrito anteriormente para proporcionar una mezcla de ácido láctico y una sal de magnesio. Esta mezcla puede someterse posteriormente a una etapa de separación de ácido láctico/sal de magnesio. La sal de magnesio puede someterse a una etapa de desdoblamiento de la sal, por ejemplo, una etapa de desdoblamiento térmico de la sal (TSS), tal como se ha descrito

anteriormente. Se hace referencia al documento WO 2011/095631 que describe un procedimiento para la preparación de ácido láctico. Este procedimiento comprende someter un lactato de magnesio a una reacción de intercambio de sales para proporcionar una sal de lactato monovalente, y someter la sal de lactato monovalente a electrodiálisis de separación de agua, para producir ácido láctico.

- 5 En varias realizaciones, el lactato de magnesio, la segunda sal de lactato o el ácido láctico obtenidos tal como se ha descrito anteriormente pueden someterse a al menos una de las siguientes operaciones: extracción líquido/líquido, nanofiltración, tratamiento con carbón activo, destilación y recristalización. Estos tratamientos pueden utilizarse para eliminar aún más las impurezas del lactato de magnesio, la segunda sal de lactato o los productos de ácido láctico.

- 10 Un producto de ácido láctico obtenido por medio de un procedimiento tal como el descrito en el presente documento puede estar en forma sólida, líquida o en solución, y puede comprender generalmente al menos un 95 % en peso de ácido láctico, preferentemente al menos un 97 % en peso de ácido láctico, más preferentemente al menos un 99 % en peso de ácido láctico, incluso más preferentemente al menos un 99,5 % en peso de ácido láctico y más preferentemente al menos un 99,9 % en peso de ácido láctico.

- 15 Un ácido láctico obtenido por un procedimiento de acuerdo con la invención es, por tanto, de gran pureza y es adecuado para su uso directo en, por ejemplo, procedimientos sintéticos, aplicaciones alimentarias y aplicaciones cosméticas. Un ácido láctico obtenido tal como se describe en el presente documento puede ser especialmente adecuado para la preparación de lactida y/o ácido poliláctico. Cualquier procedimiento convencional cuando sabido a la persona experta en la técnica puede ser utilizado para fabricación dicha de lactida y/o ácido poliláctico con tal que el material de empezar que contiene ácido láctico está hecho vía un procedimiento cuando descrito en el presente documento.

- 20 Aunque la utilidad industrial del ácido láctico es bien conocida, las impurezas procedentes de las etapas de pretratamiento, tratamiento, fermentación y/o aislamiento de un procedimiento tal como el descrito en el presente documento también pueden encontrar utilidad tras un procesamiento físico y/o químico adecuado. Se prevé que la celulosa y la lignina residuales puedan servir como combustible de caldera para la producción de electricidad o vapor. Además, la gasificación de la lignina en licor negro es un desarrollo comercial reciente. Algunas impurezas pueden utilizarse como abono, en particular el abono rico en magnesio. Y el dióxido de carbono liberado en el procedimiento de fermentación puede capturarse para su venta, por ejemplo, a la industria de bebidas.

La presente invención se ilustra en más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, sin pretender estar limitados a los mismos o por mismos.

### 30 **EJEMPLOS**

#### **Materias primas y su análisis:**

El bagazo fue suministrado por Purac Thailand Ltd. (Rayong, Tailandia). (Rayong, Tailandia).

- 35 La paja de trigo molida se obtuvo de un proveedor local. En los Ejemplos 1 a 9, la paja de trigo se molió con un molino de corte Retch (SM100) y se tamizó para obtener un tamaño medio de partícula comprendido entre 500 micras y 1 mm. En el ejemplo 10, la paja de trigo se molió en un molino de martillos (Apex Commuting Mill) con un tamaño de criba de 1,5 mm.

Mediante el uso de un Analizador Avanzado de Humedad Mettler Toledo, se midió el contenido en peso seco de muestras seleccionadas de paja de trigo molida de 0,5 - 2,0 g.

- 40 La paja de trigo y el bagazo se analizaron para determinar el contenido de hidratos de carbono, lignina soluble en ácido, lignina insoluble en ácido y cenizas de acuerdo con el procedimiento indicado en: Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en la biomasa: Laboratory Analytical Procedure (LAP), Autoridad Nacional de Energías Renovables (agosto de 2012) <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>, Determinación de cenizas en la biomasa: Procedimiento analítico de laboratorio (LAP), Autoridad Nacional de Energías Renovables (enero de 2008) <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>. En su caso, la práctica actual relativa a dichos procedimientos puede consultarse en [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html).

En su caso, la glucosa se determinó mediante el uso de el kit de ensayo Megazyme D-Glucose (glucosa oxidasa/peroxidasa; GOPOD) empleando un detector amperométrico pulsado (Roche/Hitachi GOD-PAD) y espectrofotometría (Hitachi U-2800, 540 nm). La xilosa puede determinarse mediante el uso de el kit Megazyme D-xilosa y espectrofotometría (Hitachi U-2800, 340nm).

- 50 Se determinó que el rendimiento máximo teórico de glucosa a partir de paja de trigo era del 37,1 % en peso, basado en el peso seco total.

#### **Ejemplos 1 - 9**

**Pretratamiento:** Porciones pesadas de 12,45 g de paja o bagazo de trigo molidos se mezclaron por separado en 150 ml de agua desmineralizada, tras lo cual se añadió óxido de magnesio sólido o, en su caso, óxido de calcio sólido o

hidróxido de sodio; no se añadieron más compuestos básicos. Para completar, cabe señalar que en el Ejemplo 9, el NaOH se añadió a la paja de trigo molida después del óxido de magnesio sólido, elevando así el pH de la muestra.

5 El pretratamiento de dichas muestras se llevó a cabo en un reactor agitado de acero inoxidable de doble pared (Autoclave Buchi). El reactor tenía una presión nominal de 60 bares y estaba equipado con un muelle de seguridad de presión. El calentamiento se realizó con aceite caliente hasta 190°C.

Las propiedades de cada porción separada y las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia a las que fueron sometidas se muestran en la Tabla 1 a continuación. Todas las muestras se agitaron continuamente durante el tiempo de permanencia requerido en el reactor. Además, todas las muestras tratadas con magnesio cáustico u óxido de calcio tenían un pH inicial de 8,5-9,4 antes de cualquier etapa de calentamiento.

10 **Preparación para la hidrólisis enzimática:** Los sólidos así pretratados se sometieron a una primera etapa de separación sólido/líquido mediante el uso de un filtro Buchner a presión reducida (aprox. 200 mBar). La fracción líquida se recogió para su análisis. Los sólidos se recogieron, se dispersaron en agua y se neutralizaron a un pH de 6-7 con ácido láctico.

15 A continuación, los sólidos se sometieron a una segunda etapa de separación sólido/líquido en dos etapas mediante el uso de una centrifugadora filtrante (Hermle Sieva 2) equipada con una tela filtrante de 5 micras. En una primera etapa, la centrifugadora se pone en marcha a 5000 rpm antes de aumentar a 10000 rpm; el filtrado se recoge y se añade de nuevo a la centrifugadora; se recogen muestras del filtrado y de la torta de filtración obtenidos a continuación para su análisis. En una segunda etapa, se reinicia la centrifugadora añadiéndole 1 litro de agua desmineralizada. A  
20 continuación, se recogió la fracción sólida separada y se midió su contenido en materia seca antes de someterla a hidrólisis enzimática.

**Hidrólisis enzimática:** Con un contenido de materia seca del 10% (p/p), los sólidos pretratados se hidrolizaron en tubos de polipropileno de 50 ml con una mezcla de enzimas celulasa CMAX4 disponible en Dyadic. Se empleó un tampón de fosfato potásico (pH, 6,4) y, además, azida sódica (0,02 %, p/p) para evitar la infección microbiana del hidrolizado. La cantidad añadida de enzima varió en los experimentos -como se indica en la Tabla 1-, siendo más  
25 habitual una carga de enzima de 20mg/g de peso seco, teniendo en cuenta que esta carga debería garantizar una liberación satisfactoria de carbohidratos (NREL, 2011).

Las reacciones de hidrolización se incubaron a 52°C a 300 rpm. Después de 24 horas, 48 horas y 72 horas, se tomaron muestras duplicadas de 0,2 ml y se filtraron mediante el uso de una microplaca; posteriormente, se analizaron los sobrenadantes duplicados.

30 Las concentraciones de glucosa se indican en la Tabla 1.

EJEMPLOS	Sustrato	Lavado a mano (sí/no)	Tratamiento a Temp. (°C)	Tiempo de residencia (min.)	Agente alcalino	Agente alcalino Dosis (% p/p)	Dosis de enzimas de proteína/g de sólidos secos)	Concentración de glucosa (g/L. a las 72h)
1	Paja de trigo molida	Y	190	60	MgO	12	5	23,3
2	Paja de trigo molida	Y	190	120	MgO	12	5	14,9
3	Paja de trigo molida	Y	190	60	MgO	a	5	18,1
4	Paja de trigo molida	Y	190	120	MgO	8	5	13
5	Paja de trigo molida	Y	190	60	MgO	10	20	40,6
6	Paja de trigo molida	N	190	60	MgO	10	20	37,5
7	Paja de trigo molida	Y	190	30	MgO	10	20	37,2
8	Paja de trigo molida	Y	85	480	CaO	8	20	22,9
9	Bagazo	Y	190	20	MgO + NaOH (pH=11)	10	20	13,7

**Ejemplo 10**

Este ejemplo pretende demostrar el escalado del procedimiento de pretratamiento para acomodar mayores cantidades de material lignocelulósico.

5 **Pretratamiento:** Porciones pesadas de 1,6 kg de paja de trigo molida se mezclaron por separado en 13,4 litros de agua desmineralizada, tras lo cual se añadió el óxido de magnesio sólido; no se añadieron más compuestos básicos.

10 El pretratamiento de dichas muestras se llevó a cabo en un reactor encamisado de acero inoxidable de doble pared equipado con una hélice de anclaje (Autoclave Buchi de 50 litros). El reactor tenía una presión nominal de al menos 20 bares y estaba equipado con un muelle de seguridad de presión. El calentamiento a 190°C se llevó a cabo mediante el uso de tanto inyección directa de vapor a presión como aceite caliente circulado a través de la camisa. La mezcla de reacción se agitó continuamente durante su tiempo de permanencia en el reactor.

Una vez realizada la reacción, el reactor se enfrió mediante el uso de aceite circulado por la camisa, seguido de un enfriamiento rápido efectuado liberando la presión del reactor. Posteriormente, se recogió el contenido del reactor.

15 Las propiedades del material recogido y las condiciones de temperatura y tiempo de permanencia a las que dicho material había sido sometido se muestran en la Tabla 2 a continuación. Además, las muestras que fueron tratadas con óxido de magnesio cáustico de esta manera tenían un pH inicial de 8,5-9,4 antes de cualquier etapa de calentamiento.

**Preparación para la hidrólisis enzimática:** Los sólidos así pretratados se sometieron a una primera etapa de separación sólido/líquido por gravedad mediante el uso de un tamiz de 1 mm, recogiendo la fracción líquida en un recipiente de 120 litros. Los sólidos se recogieron, se dispersaron en agua en otro recipiente de 120 litros y se neutralizaron a un pH de 6-7 con ácido láctico (solución acuosa al 50 % en peso).

20 La papilla formada se filtró de nuevo por gravedad tal como se ha descrito anteriormente (tamiz de 1 mm), excepto que 26 litros de agua desmineralizada se rociaron uniformemente sobre la torta de filtración. La torta de filtración se dividió en seis porciones (SHFPs), cada una de las cuales se prensó a una presión aplicada de 250 Bar mediante el uso de un filtro prensa de banco (Fischer MachineFabriek). A continuación, se recogió cada fracción sólida separada; posteriormente, las tortas se rompieron, homogeneizaron y distribuyeron en dos recipientes (SHFP1, SHFP2); se midió el contenido de materia seca de cada recipiente y se comprobó que oscilaba entre el 38 y el 42% (p/p).

**Hidrólisis enzimática:** Los sólidos pretratados (SHFP1) se hidrolizaron en tubos de polipropileno con una mezcla de enzimas celulasa CMAX4 disponible en Dyadic; los sólidos pretratados se añadieron en una cantidad del 10 % en peso seco (c. 1 g de peso seco). Se empleó un tampón de fosfato potásico (pH, 6,4) y, además, azida sódica (0,02 %, p/p) para evitar la infección microbiana del hidrolizado. La carga enzimática fue de 20mg/g de peso seco.

30 Las reacciones de hidrolización se incubaron a 52°C a 300 rpm. Transcurridas 24 y 48 horas, se tomaron muestras duplicadas de 0,2 ml y se filtraron con una microplaca; posteriormente, se analizaron los sobrenadantes duplicados. La concentración de glucosa al cabo de 48 horas figura en el cuadro 2.

Tabla 2

EJEMPLOS	Sustrato	Tratamiento Temp. (°C)	Tiempo de residencia (min.)	Agente alcalino	Agente alcalino Dosis (% p/p)	Dosis de enzimas (mg de proteína/g de sólidos secos)	Concentración de glucosa (g/L, a las 48h)
10	Paja de trigo molida	190	59	MgO	10	20	53,2

**Ejemplo 11**

35 **Hidrólisis enzimática:** Los sólidos pretratados (SHFP2) se hidrolizaron en una unidad Minifors adaptada para incluir un agitador helicoidal de alto par. La hidrólisis se realizó con una mezcla de enzimas celulasa CMAX4 disponible en Dyadic; los sólidos pretratados se añadieron en una cantidad del 15 % en peso, en peso seco. La carga enzimática fue de 30mg/g de peso seco.

40 Las reacciones de hidrolización se incubaron a 52°C a 200 rpm durante 48 horas; el hidrolizado (H1), con una concentración de glucosa de 76 g/L, se cosechó por centrifugación. El hidrolizado se recogió en la unidad Minifors adaptada, se diluyó con agua desmineralizada (proporción 1:1) y se mantiene posteriormente a 80°C durante 30 minutos para su pasteurización. Posteriormente, la unidad se enfría hasta alcanzar la temperatura de fermentación deseada, entre 50 °C y 54 °C.

**Fermentación:** como se utiliza en este ejemplo, *Bacillus coagulans* DSM2314 es una cepa no modificada genéticamente disponible públicamente. Se tomó una cepa de trabajo de *Bacillus coagulans* DSM2314 de un congelador a -80°C y se precultivó en un medio estéril que contenía 7,7g/l de dextrosa monohidratada, 2g/l DAP, 3,5g/l DAS, 1g/l CaCl<sub>2</sub>•5H<sub>2</sub>O, y 10g/l de pasta de extracto de levadura (50% de sólidos secos).

- 5 **Fermentación de semillas:** Para generar una fermentación de semillas, se cargó una unidad Minifors estándar con 1 litro de dicho medio de fermentación estéril. A este medio se añadieron 50 ml del inóculo anterior. El medio se agitó a 200 rpm y se mantuvo a una temperatura de 52°C durante aproximadamente 20 horas. El pH del medio también se mantuvo en 6,4 durante este periodo por medio de la adición de hidróxido de magnesio (solución acuosa al 20 % en peso) al mismo.
- 10 Posteriormente, se añadió el medio inoculado a la unidad de Minifors adaptada. El medio se agitó a 200 rpm y se mantuvo a una temperatura de 52°C. El pH del medio también se mantuvo en 6,4 durante este periodo por medio de la adición de hidróxido de magnesio (solución acuosa) al mismo.

Se tomaron muestras de 25 ml del sobrenadante regularmente, en promedio cada 3 horas, y se utilizaron para determinar la concentración de glucosa, xilosa y ácido láctico, determinándose la concentración de ácido láctico por medio de HPLC. Las mediciones se interrumpieron a las 48 horas de tiempo total cuando la concentración tanto de glucosa como de xilosa fue inferior a 0,3 g/L. La concentración final de ácido láctico se indica en el cuadro 3.

- 15

Tabla 3

Ex.	*Concentración inicial de glucosa al inicio de la fermentación (g/L)	*Concentración inicial de xilosa al inicio de la fermentación (g/L)	Fermentación (horas)	Concentración final de ácido láctico (g/L)
11	40,6	10,7	47,9	58,3
*La concentración inicial se mide en el hidrolizado después de la dilución y antes de añadir la fermentación de semillas.				

La figura 1 adjunta ilustra el cambio en la concentración de glucosa, xilosa y ácido láctico a lo largo del tiempo durante la fermentación por separado.

- 20 Las mediciones de par, aplicadas al agitador helicoidal de la unidad Minifors adaptada, se realizaron a lo largo de la hidrólisis y fermentación separadas y los puntos de datos de las mismas se muestran en la Figura 2 adjunta. La línea de esta figura procede de una regresión polinómica de los puntos de datos obtenidos.

### Ejemplo de referencia 12

- 25 También se realizaron mediciones de par durante un procedimiento simultáneo de sacarificación y fermentación tal como se define a continuación.

**Pretratamiento:** Se pretrataron porciones pesadas de 1,6 kg de paja de trigo molida de manera idéntica a la descrita anteriormente para el Ejemplo 10. Las propiedades del material recogido y las condiciones de temperatura y tiempo de permanencia a las que se ha sometido dicho material se muestran en la Tabla 2. Además, tal como anteriormente, las muestras que fueron tratadas con óxido de magnesio cáustico de esta manera tenían un pH inicial de 8,5-9,4 antes de cualquier etapa de calentamiento del reactor.

- 30

**Preparación para la sacarificación y fermentación simultáneas:** Los sólidos así pretratados se sometieron a una primera etapa de separación sólido/líquido por gravedad mediante el uso de un tamiz de 1 mm, recogándose la fracción líquida en un recipiente de 120 litros. La torta de filtración se dividió en 11 porciones (SSFs), cada una de las cuales se prensó a una presión aplicada de 250 Bar mediante el uso de un filtro prensa de banco (Fischer MachineFabriek). A continuación, se recogió cada fracción sólida separada; posteriormente, se rompieron las tortas, se homogeneizaron y se distribuyeron en dos recipientes (SSF1, SSF2). El contenido medio de materia seca de cada recipiente se midió como: 40.26 % p/p, SSF1; y, 42,95 % p/p, SSF2.

- 35

### Sacarificación y fermentación simultáneas

Como se utiliza en este Ejemplo, *Bacillus coagulans* DSM2314 es una cepa disponible públicamente, no OGM. Se tomó una cepa de trabajo de *Bacillus coagulans* DSM2314 de un congelador a -80°C y se precultivó en un medio estéril que contenía 7,7g/l de dextrosa monohidratada, 2g/l DAP, 3,5g/l DAS, 1g/l CaCl<sub>2</sub>•5H<sub>2</sub>O, y 10g/l de pasta de extracto de levadura (50% de sólidos secos).

- 40

**Fermentación de semillas:** Para generar una fermentación de semillas, se cargó una unidad Minifors estándar con 1 litro de dicho medio de fermentación estéril. A este medio se añadieron 50 ml del inóculo anterior. El medio se agitó a

200 rpm y se mantuvo a una temperatura de 52°C durante aproximadamente 20 horas. El pH del medio también se mantuvo en 6,4 durante este periodo por medio de la adición de hidróxido de magnesio (solución acuosa) al mismo.

La sacarificación y la fermentación simultáneas se llevaron a cabo en otra unidad Minifors adaptada para incluir un agitador helicoidal de alto par y una bomba externa de 1 rpm para la adición de lodo a dicha unidad.

5 En este ejemplo, se empleó una etapa de presacarificación de dos horas, en la que el sustrato (SSF1) se cargó primero en la unidad de Minifors adaptada en ausencia del inóculo a una carga de sustrato del 5% (p/p) de materia seca. La presacarificación se realizó con la mezcla de enzimas celulasa CMAX4 (Dyadic) a una carga enzimática de 20mg/g de peso seco; a un volumen inicial de 1300 ml, el medio de presacarificación se agitó a 200 rpm y se mantuvo a una temperatura de 52°C y un pH de 6-7.

10 Después de dos horas, se introdujeron 100 ml del inóculo y se mantuvo el reactor en las condiciones anteriores de agitación, temperatura y pH durante otras 3 horas, mediante el uso de nuevo hidróxido de magnesio para controlar el pH.

15 A continuación, se paró el agitador y se introdujo la primera dosis de 50 g de sustrato (SSF1); después se volvió a poner en marcha el agitador a 200 rpm y se moderó la temperatura del reactor a 52°C, si era necesario. Se controló el pH y se añadieron otras dosis de 50 g de sustrato del mismo modo cuando el pH del medio cayó por debajo de 6,4. Dicha adición de sustrato se continuó hasta que el contenido del reactor fue de aproximadamente un 20% (p/p) de materia seca.

20 Las mediciones de par, aplicadas al agitador helicoidal de la unidad Minifors adaptada, se realizaron durante el transcurso del SSF y también se muestran en la Figura 2 adjunta. Las mediciones se interrumpieron a las 24 horas en total (tiempo de presacarificación más tiempo de SSF).

Será evidente para los expertos en la técnica, tras la consideración de la especificación, que se pueden realizar varias modificaciones en las realizaciones divulgadas sin apartarse del alcance de la invención. Por lo tanto, se pretende que las realizaciones y los ejemplos se consideren únicamente ilustrativos, indicándose el verdadero alcance de la invención en las reivindicaciones siguientes.

25

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar ácido láctico y/o una sal de lactato que comprende:
  - a) tratar un material lignocelulósico con un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio en presencia de agua para obtener un material lignocelulósico acuoso tratado;
  - 5 b) sacarificar el material lignocelulósico acuoso tratado en presencia de una enzima hidrolítica para obtener un material lignocelulósico acuoso sacarificado que comprenda carbohidratos fermentables y una fracción lignocelulósica sólida;
  - c) fermentar los hidratos de carbono fermentables en el material lignocelulósico acuoso sacarificado por medio de un microorganismo productor de ácido láctico en presencia de un agente alcalino que comprenda una sal cáustica de magnesio para proporcionar un caldo de fermentación acuoso que comprenda una sal magnésica de ácido láctico; y,
  - 10 d) aislar el ácido láctico y/o una sal de ácido láctico del caldo de fermentación,

donde la etapa de sacarificación b) y la etapa de fermentación c) se realizan como dos etapas separadas.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 comprende someter el material lignocelulósico a al menos uno de los siguientes tratamientos: tratamiento ácido, tratamiento con disolventes y tratamiento con vapor, antes de tratar el material lignocelulósico con el agente alcalino de la etapa a).
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 comprende tratar el material lignocelulósico con el agente alcalino de la etapa a)
  - i) a un pH de 4,0 a 14,0, en particular de 5,0 a 13,0, más en particular de 6,0 a 12,0;
  - 20 ii) a una temperatura comprendida entre 15 y 250 °C, en particular entre 30 y 200 °C; y,
  - iii) durante un período de tiempo comprendido entre 1 minuto y 600 minutos, en particular entre 1 minuto y 480 minutos y preferentemente entre 30 y 250 minutos.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 comprende someter el material lignocelulósico a un tratamiento ácido antes de tratar dicho material con el agente alcalino de la etapa a),
  - 25 en el que dicho tratamiento ácido comprende mezclar dicho material lignocelulósico con una solución acuosa ácida que tenga una concentración de 8 % en peso o menos de ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido inorgánico, ácido orgánico, aminoácido, ácido mineral, ácido de Bronsted, ácido de Lewis y mezclas de los mismos, y

donde dicha mezcla tiene lugar a una temperatura de 120°C a 230°C.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el tratamiento de la etapa a) se realiza
  - i) a un pH de 2 a 10, preferentemente de 4,0 a 9,0, más preferentemente de 4,5 a 8 y más preferentemente de 4,5 a 5,5;
  - ii) a una temperatura de 15 a 100°C, preferentemente de 30 a 80°C; y
  - iii) durante un periodo de 1 a 30 minutos,

35 para neutralizar el material lignocelulósico tratado con ácido.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende realizar la sacarificación de la etapa b) y/o la fermentación de la etapa c)
  - i) a un pH comprendido entre 2,0 y 10,0, en particular entre 4,0 y 9,0; y
  - ii) a una temperatura comprendida entre 30 y 80 °C, en particular entre 45 y 70 °C.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende realizar la sacarificación de la etapa b)
  - i) a un pH comprendido entre 4,5 y 5,5; y
  - ii) a una temperatura comprendida entre 50 y 60 °C.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 comprende ajustar el pH del material lignocelulósico acuoso tratado de la etapa a) por medio de acidificación antes de la sacarificación de la etapa b), en la que la acidificación se realiza preferentemente con ácido láctico.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 comprende someter el material lignocelulósico acuoso sacarificado a una etapa de separación sólido/líquido antes de la fermentación de la etapa c) para eliminar la fracción lignocelulósica sólida del material lignocelulósico sacarificado que comprende los
  - 50 carbohidratos fermentables.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 comprende someter el material lignocelulósico acuoso sacarificado a una etapa de concentración y/o a una etapa de detoxificación antes de la fermentación de la etapa c).
- 5 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 comprende fermentar el material lignocelulósico acuoso sacarificado
- i) a un pH comprendido entre 5,5 y 7,5, y
  - ii) a una temperatura comprendida entre 50 y 60 °C.
- 10 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el lactato de magnesio se trata con un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y/o ácido nítrico, preferentemente ácido clorhídrico en presencia de agua para proporcionar ácido láctico.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende las etapas de:
- e) proporcionar un pienso que contenga cloruro de hidrógeno, ya sea una solución acuosa que contenga cloruro de hidrógeno o un gas que contenga cloruro de hidrógeno gaseoso;
  - f) acidificar el lactato de magnesio recuperado hasta ácido láctico poniendo dicho lactato de magnesio en contacto con dicho pienso que comprende cloruro de hidrógeno, formando así un efluente líquido que comprende ácido láctico y cloruro de magnesio;
  - g) separación de la lignina del efluente líquido producto de la etapa f); y,
  - h) separación del ácido láctico y del cloruro de magnesio presentes en el efluente líquido de la etapa g) para obtener una corriente de producto de ácido láctico y una solución o suspensión de cloruro de magnesio.
- 15
- 20 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el lactato de magnesio se convierte en una segunda sal de lactato, en cuya conversión el lactato de magnesio se somete a una reacción de intercambio de sales con una base monovalente para formar una segunda sal de lactato monovalente y una sal de magnesio.
- 25 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el lactato de magnesio, la segunda sal de lactato o el ácido láctico se someten a una o más de las siguientes técnicas: extracción líquido/líquido, nanofiltración/tratamiento con carbón activo, destilación y recristalización.

Fig. 1

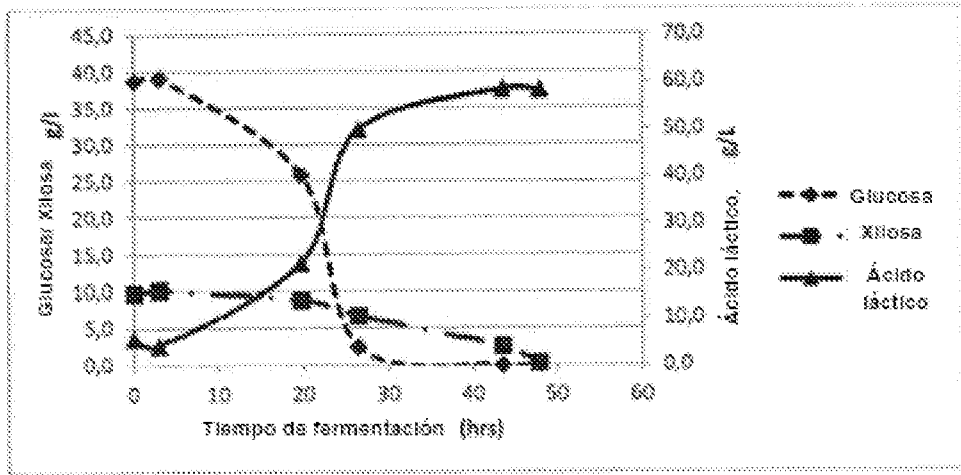


Fig. 2

